



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Julien Pedron**

**le** vendredi 5 octobre 2018

**Titre :**

Synthèse et étude de l'activité anti-kinétoplastidés  
de nouvelles 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones  
bioactivées par les nitroréductases de type 1.

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS - UPR 8241

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Pr. Pierre Verhaeghe

Pr. Alexis Valentin

**Jury :**

Pr. Line Bourel, Professeur, Université de Strasbourg, Rapporteur

Pr. Pascal Marchand, Professeur, Université de Nantes, Rapporteur

Pr. Sylviane Giorgi-Renault, Professeur, Université Paris Descartes, Examineur

Pr. Nicolas Fabre, Professeur, Université Toulouse III Paul Sabatier, Examineur

Dr. Susan Wyllie, Assistant Professeur, Université de Dundee, Membre invité

Pr. Pierre Verhaeghe, Professeur, Université Toulouse III Paul Sabatier, Directeur de thèse

Pr. Alexis Valentin, Professeur, Université Toulouse III Paul Sabatier, Co-directeur de thèse

## Remerciements

*A la fin de ces 3 années de thèse, réalisées au Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont participé à ce projet ou qui m'ont apporté leur soutien tant au niveau moral que scientifique.*

*Je remercie tout d'abord le Dr **Geneviève Pratviel**, responsable de l'équipe K du Laboratoire de Chimie de Coordination lors de mon arrivée, pour m'avoir accueilli dans son groupe en 2015 et m'avoir ainsi offert une première expérience dans le domaine de la recherche en chimie. Merci également pour vos bons conseils, vos remarques toujours pertinentes et votre disponibilité.*

*Un énorme merci au Pr **Pierre Verhaeghe**, mon directeur de thèse, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche en chimie thérapeutique ainsi que pour ses précieux conseils tant au niveau professionnel que personnel. Ta bienveillance quotidienne, ta patience en toutes circonstances et ta rigueur scientifique m'ont fait grandir et progresser année après année. Tes formidables qualités pédagogiques m'avaient donné l'envie de poursuivre en doctorat, et me donnent aujourd'hui l'envie de continuer ma carrière dans le monde de la recherche.*

*Je remercie également le Pr **Alexis Valentin**, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance et permis de travailler sur ce beau projet. Je te suis très reconnaissant d'avoir toujours répondu présent dans les moments où j'en ai eu le plus besoin et de te préoccuper de mon avenir post-doctorat. Ta bonne humeur constante et ta clairvoyance scientifique à l'origine de nombreuses idées pertinentes ont été des plus agréables durant cette thèse.*

*Je tiens à remercier le Pr **Line Bourel**, de l'Université de Strasbourg, qui me fait l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et ainsi d'évaluer ce travail. Je suis également reconnaissant de sa disponibilité et de son déplacement à Toulouse pour la soutenance orale de cette thèse.*

*Merci également au Pr **Pascal Marchand**, de l'Université de Nantes, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire et de juger ce travail lors de la soutenance orale. Qu'il trouve ici ma reconnaissance pour son déplacement dans la ville rose.*

*Je remercie le Pr **Sylviane Giorgi-Renault**, de l'Université de Paris Descartes pour avoir accepté d'être examinateur du travail réalisé dans le cadre de cette thèse. Je suis également reconnaissant de sa disponibilité et de sa venue à Toulouse en Octobre prochain.*

*Je souhaite remercier le Pr **Nicolas Fabre**, de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier, qui me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Qu'il trouve ici ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner le travail réalisé au cours de ces trois dernières années.*

## Remerciements

*Je remercie enfin le **Dr Susan Wyllie**, de l'Université de Dundee, non seulement pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse mais aussi pour sa disponibilité et son efficacité lors des études de bioactivation de nos molécules par les nitroréductases parasitaires.*

***Je remercie tout particulièrement ma famille et mes amis,***

*A commencer par **mes parents**, qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont soutenu depuis toutes ces années. Tout au long de mon parcours universitaire, vous m'avez toujours accordé votre confiance et permis d'avoir des conditions de vie propices à la réussite. Si aujourd'hui j'en suis là, c'est majoritairement grâce à vous, et vous trouverez en ces lignes les marques de la gratitude et de l'amour que j'ai envers vous.*

*Je remercie également **ma sœur**, que je n'oublie évidemment pas malgré la distance et ma fâcheuse tendance à ne pas prendre de nouvelles. Merci pour tous ces moments de rires et de complicité durant toutes ces années. Sache que je suis immensément fier de ton parcours et de la femme que tu es devenue.*

*A **mes grands-mères**, que je prends plaisir à voir à chaque fois que je rentre en Bretagne, et qui sont fières de mon parcours. Je vous remercie pour toute l'attention, la bienveillance et la gentillesse que vous m'avez accordées lors des nombreux week-ends et vacances scolaires passés à Morlaix et St-Thégonnec.*

*Je remercie également chaleureusement **Lilian**, sans qui cette dernière année de thèse aurait sûrement été beaucoup plus difficile à vivre. Ton affection, tes encouragements et ta présence quotidienne à mes côtés depuis un an, dans les bons comme les mauvais moments, m'ont donné la force nécessaire pour terminer ce projet. Sache que je suis plus qu'heureux en ta compagnie, et j'espère que nous continuerons à découvrir le monde, ensemble.*

*A **Thibaut, Roxane et Mickael**, votre amitié fidèle depuis plus de 10 ans est importante pour moi, et je vous remercie d'avoir été présents à chaque fois que j'ai eu besoin d'une oreille attentive. Chacun de vos messages durant ces 3 ans m'a fait plaisir. Les notions de viguile et de tout la liche n'auront jamais aussi bien porté leur nom qu'en votre compagnie.*

*Un immense merci au **Dr Cyril Fersing**, dont la présence quotidienne ces dernières années m'aura éloigné des fameux « 3% », plus particulièrement encore ces dernières semaines. Tu auras égayé le laboratoire lors de ces quelques mois à Toulouse, via des danses endiablées sur ce grand tube qu'est la « cumcum » ou en appréciant à sa juste valeur le talent d'un certain Walid. Je te remercie également de m'avoir généreusement accueilli pendant une semaine à Marseille, même si leurs trottoirs ne resteront point dans mon cœur.*

## Remerciements

*Je remercie également mes amis toulousains, **Marion, Céline, Nicolas et Jean-Sébastien**, qui sont toujours partant pour sortir et qui m'ont permis de me détendre à des moments où j'en avais vraiment besoin. On se retrouvera très bientôt à la rentrée pour fêter ça !*

*Pour finir, je souhaite également remercier tous mes amis de Bretagne, **Steve, Benjamin, David, Mathieu et Jérémy** parmi d'autres, qui malgré la distance restent des personnes chères à qui je souhaite le meilleur dans leurs carrières respectives et leurs projets personnels.*

**Je remercie également tous mes collègues de l'équipe K du LCC,**

*A commencer par le Dr **Colin Bonduelle**, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant ces 3 dernières années. Pour ta bonne humeur quotidienne, ton optimisme à toute épreuve et ton incroyable créativité, à l'origine de nombreuses idées pertinentes tant au niveau chimie qu'au niveau cartes de visite. De plus, grâce à toi, j'ai découvert les journées randonnées dans les Pyrénées et je sais désormais placer Banjul sur une carte du monde. Je te souhaite le meilleur dans ta future vie professionnelle comme personne qui se profile en Gironde.*

*Je remercie également le Dr **Michel Nguyen**, pour sa joie de vivre quotidienne au laboratoire, très communicative, et pour ses précieux conseils expérimentaux lorsque j'ai rencontré des difficultés de synthèse ou des purifications délicates. Tu as rendu ces années au LCC encore plus agréables, et j'espère que tu me pardonneras un jour les humiliations en série que tu as dû subir au badminton, amateur.*

*Un grand merci au Dr **Jean-Luc Stigliani**, pour son extrême gentillesse et pour avoir apporté sa précieuse expertise sur ce travail de thèse. Je te remercie aussi pour la patience dont tu as fait preuve afin de m'expliquer quelques principes fondamentaux de la chimie théorique. Enfin, je te remercie de m'avoir tenu compagnie chaque soir jusqu'à des heures souvent avancées, qui m'ont permis de progresser un peu plus dans mes travaux de synthèse organique.*

*Merci également à Mme **Emmanuelle Martin-Mothes**, qui m'aura aidé à synthétiser quelques molécules me permettant de me concentrer sur d'autres objectifs pendant cette période. Je te remercie également pour ta gentillesse et pour avoir toujours répondu présente lorsque j'ai eu besoin de matériel de laboratoire ou de conseils pour réaliser un montage expérimental.*

*Je remercie le Pr **Jean Bernadou** pour l'œil critique qu'il a apporté à ce travail lors des nombreux séminaires d'équipe et pour les suggestions pertinentes qu'il a pu émettre. Je vous remercie également grandement pour les quelques mots d'encouragement que vous m'avez donné lors de cette dernière ligne droite de rédaction de ce manuscrit.*



## Remerciements

*Un grand merci aux anciens comme aux nouveaux doctorants de cette équipe. Je remercie tout d'abord le Dr **Julie Laborde** pour sa bonne humeur et pour avoir pris le temps de m'expliquer comment fonctionne le laboratoire au quotidien. Merci également pour cette fameuse soirée wii qui restera très certainement dans ma mémoire. Je remercie également **Antoine Tronnet** pour sa sympathie, son entrain pour tous types de sorties et pour m'avoir fait vivre SIX très grands moments, UN soir de Mars 2017.*

*Enfin je remercie **Pedro Salas** et **Ghada Manai** pour leur présence toujours chaleureuse depuis un an, et notamment pour les excellents repas que nous avons partagés ensemble. Je vous souhaite à tous le meilleur, avec toute la réussite qui y est associée tant sur le plan professionnel que sur le plan privé.*

*Je remercie chaleureusement tous les étudiants de M1 et de M2 qui sont passés dans l'équipe ces trois dernières années. Un grand merci particulièrement à **Maryam Rastegari**, à **Mansour Abdoulaye**, à **Benjamin Maillard** et à **Justine Bergé** qui ont tous contribué à leur manière à ce travail de thèse et qui m'auront permis de progresser tant sur le plan scientifique que sur le plan pédagogique. Je remercie également **Adrien**, **Lucas**, **Kévin**, **Ayoub**, **Florian**, **Gaël** et **Michèle** qui ont tous apporté leur dynamisme, leur joie de vivre et leur gentillesse lorsqu'ils étaient présents au laboratoire.*

***Je remercie également tous les autres membres du LCC et de la faculté de pharmacie de Toulouse qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse,***

*Je remercie grandement le Dr **Celine Deraeve** pour les conseils qu'elle a pu me donner tout au long de ces trois ans de thèse, tant sur le plan expérimental que sur le plan pédagogique, lors des nombreuses séances de TP que nous avons partagées à la faculté de pharmacie de Toulouse. Je te remercie également pour avoir régulièrement pris des nouvelles de l'avancée de ce travail et notamment de celle de la rédaction de ce manuscrit.*

*Je remercie également le Pr Vania Bernardes-Génisson, le Dr Cécile Arellano, Mme **Marie-Noëlle Paludetto**, Mme **Claire Giamarchi-Medale** et Mme **Hélène Fontet-Basso**, qui m'ont toutes apportées leur aide lors des différentes séances de TP réalisées depuis deux ans.*

*Un grand merci au Dr **Alexandre Pocinho** et au futur Dr **Omar Sadek** de l'équipe F, qui m'ont tous les deux tenu compagnie lors des très nombreuses purifications réalisées via le chromatoflash, ne manquant pas de rire de mon désarroi lorsque la réussite n'était pas au rendez-vous. Je remercie particulièrement Omar, pour m'avoir tenu compagnie tous les samedis et tous les dimanches au laboratoire depuis le mois de Janvier, et pour son soutien inestimable lors de la phase de rédaction de ce manuscrit. Je te souhaite de trouver très rapidement un travail après ta soutenance orale et de réussir dans tout ce que tu voudras entreprendre.*

## Remerciements

*Je remercie chaleureusement le Dr **Alix Sournia-Saquet** et Mr **Alain Moreau**, du service d'électrochimie du LCC, pour leur participation importante à ce projet via la mesure des potentiels de réduction de toutes les molécules synthétisées au cours de cette thèse, parfois dans des délais très courts. Un énorme merci particulièrement à Alix, qui m'a grandement aidé à la rédaction de la partie électrochimie de ce manuscrit, et qui a passé beaucoup de temps à m'expliquer les bases de la voltampérométrie cyclique.*

*Merci au Dr **Christian Bijani** et au Dr **Yannick Coppel**, du service de RMN du LCC, pour leur gentillesse, leur disponibilité et pour avoir réalisé de nombreuses expériences de RMN sur les molécules synthétisées au cours de cette thèse.*

*Je remercie le Dr **Laure Vendier**, du service de diffraction des rayons X du LCC, pour sa disponibilité à toute heure de la journée et pour avoir toujours pris le temps d'analyser les cristaux que je lui ai apportés. Je vous remercie également d'avoir toujours répondu aux nombreuses questions que j'ai pu avoir, notamment concernant la caractérisation de la liaison hydrogène intramoléculaire des molécules synthétisées au cours de cette thèse.*

*Enfin un immense merci au Dr **Sandra Bourgeade-Delmas** qui m'aura tout appris sur les tests d'évaluation biologique sur *Leishmania* et sur la lignée humaine HepG2. Je te suis très grandement reconnaissant pour la patience dont tu as fait preuve avec moi lorsque tu m'as formé alors que je n'avais jamais mis les pieds sur une plateforme cellulaire. Je te remercie également pour ta disponibilité chaque fois que j'ai eu besoin de te poser des questions et pour les nombreuses préparations que tu as faites en amont afin que mes expériences de biologie se déroulent au mieux.*

*Je remercie également le Dr **Lucie Paloque**, pour sa profonde gentillesse, son aide sur la plateforme cellulaire et pour les précieux conseils qu'elle a pu me donner durant ces 3 années, visant à me faire progresser au niveau expérimental. Je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour les années à venir.*

***Je souhaite également remercier l'ensemble de nos collaborateurs, qui ont tous participé dans leur domaine à l'avancée de ce travail,***

*Mes remerciements vont à Mme **Catherine Claparols** pour la réalisation de toutes les analyses HRMS des molécules synthétisées pendant ces 3 années de thèse.*

## Remerciements

*Je remercie le Dr **Bertrand Courtioux** et Mme **Clotilde Boudot**, de l'Université de Limoges, pour leur contribution à ce travail à travers l'évaluation biologique sur *Trypanosoma brucei brucei* de toutes les molécules synthétisées pendant cette thèse. Je remercie particulièrement Clotilde, pour sa motivation, son dynamisme et sa réactivité à toute épreuve qui ne peuvent être que positifs à la bonne avancée d'un projet de recherche. Je te suis également reconnaissant d'avoir accepté de m'accompagner à Lyon, pour réaliser une communication orale en binôme. Je te souhaite une bonne fin de thèse, on aura sûrement l'occasion de se recroiser lors des prochaines années.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Mr **Sébastien Hutter** et le Pr **Nadine Azas**, de l'Université d'Aix-Marseille, pour m'avoir accueilli si gentiment pendant une semaine dans leur laboratoire, pour l'évaluation biologique sur les formes promastigote et amastigote intramacrophagique de *Leishmania donovani* et pour les tests d'Ames réalisés sur nos meilleures molécules. Je suis particulièrement reconnaissant envers Sébastien pour m'avoir accompagné quotidiennement pendant cette semaine, pour sa gentillesse et pour m'avoir transmis des magnifiques photos d'amastigotes intramacrophagiques de *Leishmania donovani*. Je remercie également le Dr **Michèle Laget** pour son aide pratique comme théorique lors des tests d'Ames réalisés dans le cadre de ce travail.*

*Je souhaite adresser un grand merci au Pr **Elisa Boutet**, de l'Université Paul Sabatier, pour sa gentillesse, son dynamisme et pour le temps qu'elle a pris pour me montrer l'aspect expérimental d'un test des comètes. Un grand merci pour ta bonne humeur qui a été une bouffée d'air frais lors des longues sessions de comptage de cellules.*

*Un grand merci une nouvelle fois au Dr **Susan Wyllie** et au Pr **Alan H Fairlamb**, de l'Université de Dundee, pour les études de bioactivation de nos meilleures molécules par les nitroréductases parasitaires. Je vous suis aussi très reconnaissant pour le temps que vous avez passé dans la correction des différents papiers que nous avons écrits et pour les idées toujours pertinentes que vous avez pu avoir lors des différentes réunions que nous avons effectuées au cours de cette thèse.*

*Je remercie le Pr **Aurélien Malzert-Fréon**, le Dr **Marc Since** et Mme **Sophie Corvaisier**, de l'Université de Caen, pour l'évaluation du passage de la barrière hémato-encéphalique sur nos meilleurs composés.*

*Je tiens à remercier également Mme **Catherine Piveteau** et Mr **Alexandre Biela**, de l'Université de Lille II, pour la réalisation des études de stabilité microsomale et de fixation à l'albumine humaine des meilleures molécules synthétisées au cours de ce travail de thèse.*

## Abréviations

ADEPT	Antibody directed enzyme prodrug therapy
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et élimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
ama.	Amastigote
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Ar	Aryle
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
AVCI	Années de vie corrigées de l'incapacité
axé.	Axénique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Boc <sub>2</sub> O	Dicarbonate de di-tert-butyle
CC <sub>50</sub>	Concentration cytotoxique à 50%
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDC	Centre pour le contrôle et la prévention des maladies
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice à 50%
CV	Carbone vitreux
d	Doublet
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dd	Doublet de doublet
DFT	Density Functional Theory
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNDi	Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i>
ECS	Electrode au calomel saturé
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ENH	Electrode normale à hydrogène
équiv.	Equivalent
ESI+/-	Ionisation positive ou négative par électrospray
FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fc	Ferrocène
FMN	Flavine mononucléotide

FMO	Flavine mono-oxygénase
GSH	Glutathion
GSK	GlaxoSmithKline
His	Histidine
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IM	Intramusculaire
intraM	Intramacrophagique
IS	Index de sélectivité
IV	Intraveineuse
<i>L. dono.</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. inf.</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LC	Leishmaniose cutanée
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCM	Leishmaniose cutanéomuqueuse
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
LDL	Lipoprotéine à basse densité
LDPKA	Leishmaniose dermique post-kala-azar
Lit	Littérature
LMT	<i>Leishmania</i> miltefosine transporter
LogP	Coefficient de partage
LV	Leishmaniose viscérale
m	multiplet
M.O.	Micro-ondes
MC	Maladie de Chagas
MMS	Méthane sulfonate de méthyle
MTN	Maladies tropicales négligées
MZN	Maladies zoonotiques négligées
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NECT	Nifurtimox-eflornithine combination therapy
NTR	Nitroréductase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONGs	Organisations non gouvernementales
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PBS	Phosphate buffered saline
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	(Diphénylphosphinoferrocène)dichloropalladium (II)

Pd(OAc) <sub>2</sub>	Acétate de Palladium (II)
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Bis(triphénylphosphine)dichloropalladium (II)
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Tétrakis(triphenylphosphine) de Palladium (0)
PDB	Protein Data Base
Pe	Coefficient de perméabilité
ppm	Partie par million
pro.	Promastigote
q	quadruplet
R&D	Recherche et développement
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive oxygen species
RSA	Relations structure-activité
RX	Rayons X
s	Singulet
SE	Surexprimée
sl	Singulet large
SN <sub>2</sub>	Substitution nucléophile d'ordre 2
t	Triplet
t. a.	Température ambiante
<i>T. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TAA	Trypanosomiase animale africaine
TBAPF <sub>6</sub>	Tetrabutylammonium hexafluorophosphate
Tdec	Température de décomposition
TDR	Research and Training in Tropical Diseases
THA	Trypanosomiase humaine africaine
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilane
TNT	2,4,6-trinitrotoluène
trypo.	Trypomastigote
UNDP	United Nations Development Program
UNICEF	United Nations Children's Fund
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

# Sommaire

<b>Introduction générale</b>		<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Les kinétoplastidés, des parasites responsables de maladies tropicales négligées.</b>		<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Les maladies tropicales négligées.....</b>	<b>6</b>
1.1.	Définition.....	6
1.2.	Objectifs et solutions mises en place dans la lutte contre les MTNs.....	8
1.3.	Premiers résultats et perspectives.....	11
<b>2.</b>	<b>Les Leishmanioses.....</b>	<b>13</b>
2.1.	Epidémiologie.....	13
2.2.	Leishmania, un parasite au cycle de vie complexe.....	15
2.2.1	Les différentes espèces de <i>Leishmania</i> .....	15
2.2.2.	Le cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	16
2.3	Les différentes formes cliniques de la maladie.....	18
2.3.1.	La leishmaniose cutanée.....	18
2.3.2.	La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).....	19
2.3.3.	La leishmaniose viscérale (LV).....	19
2.4.	Les traitements de la leishmaniose viscérale.....	21
2.4.1.	Les dérivés d'Antimoine.....	21
2.4.2.	La Pentamidine.....	22
2.4.3.	La Paromomycine.....	24
2.4.4.	L'Amphotéricine B.....	25
2.4.5.	La Miltéfosine.....	27
2.4.6.	Bilan des traitements disponibles contre la leishmaniose viscérale.....	28
<b>3.</b>	<b>Les trypanosomiasés.....</b>	<b>28</b>
3.1.	Epidémiologie.....	28
3.2.	La Trypanosomiasé Humaine Africaine (THA).....	29
3.2.1.	Epidémiologie.....	29
3.2.2.	Trypanosoma, un parasite au cycle de vie complexe.....	30
3.2.3.	Formes cliniques de la Trypanosomiasé Humaine Africaine.....	33
3.3.	La maladie de Chagas.....	33
3.3.1.	Epidémiologie.....	33
3.3.2.	Le cycle de vie de Trypanosoma Cruzi.....	34
3.3.3.	Les symptômes de la maladie de Chagas.....	35
3.4.	Les traitements contre la Trypanosomiasé Humaine Africaine.....	36
3.4.1.	Les traitements du stade 1 de la THA.....	37
3.4.1.1.	La Pentamidine.....	37
3.4.1.2.	La Suramine.....	38
3.4.2.	Les traitements du stade 2 de la THA.....	39
3.4.2.1.	Le Méarsoprol.....	39
3.4.2.2.	L'Eflornithine.....	40
3.4.2.3.	Le Nifurtimox.....	42
3.4.3.	Bilan.....	44
3.5.	Les traitements contre la Maladie de Chagas.....	45
3.5.1.	Le Nifurtimox.....	45
3.5.2.	Le Benznidazole.....	46
<b>Chapitre 2 : Molécules antikinétoplastidés en développement et bioactivation de composés nitroaromatiques par les nitroréductases parasitaires.</b>		<b>48</b>



<b>1.</b>	<b>Les molécules en développement.....</b>	<b>49</b>
1.1.	Les nouvelles molécules en essais cliniques.....	49
1.1.1.	Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la THA.....	49
1.1.1.1.	Les benzoxaboroles.....	49
1.1.1.2.	Le fexinidazole.....	51
1.1.2.	Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la LV.....	52
1.1.2.1.	Les 8-aminoquinoléines.....	52
1.1.2.2.	Le fexinidazole.....	54
1.1.3.	Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la MC.....	54
1.1.3.1.	Le fexinidazole.....	54
1.1.3.2.	Le fosravuconazole.....	55
1.2.	Essais pré-cliniques.....	55
1.2.1.	Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la LV.....	55
1.2.2.	Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la THA.....	58
1.2.3.	Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la maladie de Chagas.....	60
<b>2.</b>	<b>Focus sur les composés nitroaromatiques, historique.....</b>	<b>61</b>
2.1.	Les 5-nitroimidazoles.....	63
2.2.	Les 2-nitroimidazoles.....	64
2.3.	Les 5-nitrofuranes.....	64
2.4.	Les 5-nitrothiazoles.....	65
<b>3.</b>	<b>Mécanisme d'action antiparasitaire des dérivés nitroaromatiques.....</b>	<b>66</b>
3.1.	Nitroréductases bactériennes et nitroréductases parasitaires.....	66
3.2.	Les deux voies de réduction du groupement NO <sub>2</sub> par les nitroréductases.....	69
3.2.1.	Réduction à 2 électrons, par les nitroréductases de type I.....	69
3.2.2.	Réduction à 1 électron, par les nitroréductase de type II.....	71
3.3.	Des enzymes présentes chez les parasites responsables de la LV et de la THA.....	72
3.3.1.	NTR1, une nitroréductase de type I chez <i>Leishmania</i> .....	72
3.3.2.	NTR2, une nitroréductase de type 2 chez <i>Leishmania</i> .....	74
3.3.3.	NTR, une nitroréductase de type 1 chez <i>Trypanosoma</i> .....	76
3.4.	Mécanisme d'action antiparasitaire à la suite d'une bioactivation par une NTR.....	77
3.4.1.	Mécanisme d'action antiparasitaire <i>via</i> une bioactivation par NTR1.....	77
3.4.2.	Mécanisme d'action antiparasitaire <i>via</i> une bioactivation de NTR2.....	78
3.5.	Les composés nitroaromatiques, des molécules mutagènes ?.....	79
3.5.1.	Contexte.....	79
3.5.2.	Le test d'Ames.....	80
3.5.3.	Le test des comètes.....	82
3.5.4.	Le test du micro-noyau.....	83
3.6.	Les nitroréductases parasitaires en chimie thérapeutique.....	85
<b>4.</b>	<b>Découverte d'un nouveau hit antileishmanien en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones en 2012.....</b>	<b>87</b>
4.1.	Etude du pharmacophore.....	87
4.2.	Pharmacomodulation antileishmanienne en position 4 du noyau.....	87
4.3.	Définition d'un hit et d'un lead anti- <i>Trypanosomatidae</i> .....	88
<b>5.</b>	<b>Objectifs de thèse.....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre 3 : Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-Kinétoplastidés.</b>		<b>93</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>93</b>
<b>2.</b>	<b>Travaux de synthèse hétérocyclique.....</b>	<b>94</b>
2.1.	Etude du pharmacophore antiparasitaire.....	94
2.1.1.	Synthèse d'un analogue dépourvu de fonction lactame : 8-nitroquinoléine.....	94

2.1.2.	Introduction d'un nouvel hétéroatome dans la structure : synthèse de la 8-nitroquinoxalin-2(1 <i>H</i> )-one.....	95
2.1.3.	Synthèse d'analogues à fonction amide extra-cyclique.....	95
2.1.3.1.	Préparation du <i>N</i> -(2-nitrophényl)-acétamide.....	95
2.1.3.2.	Synthèse de la 7-acétylamino-8-nitroquinoléine.....	95
2.2.	Pharmacomodulation antikinétoplastidés en position 4 du noyau 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-ones.....	96
2.2.1.	Préparation de la 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	97
2.2.2.	Synthèse de la 4-hydroxyméthyl-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	97
2.2.3.	Introduction d'une chaîne de type 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine.....	98
2.2.4.	Synthèse de la 4-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	99
2.3.	Préparation de molécules antikinétoplastidés depuis la 2-chloroquinoléine....	100
2.3.1.	Fonctionnalisation de la 2-chloroquinoléine.....	100
2.3.1.1.	Synthèse de dérivés de la quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	100
2.3.1.1.1.	Préparation de la quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	100
2.3.1.1.2.	Nitration de la quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	100
2.3.1.1.3.	Méthylation de la quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	101
2.3.2.	Synthèse de dérivés de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	101
2.3.2.1.	Préparation de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	101
2.3.2.2.	Méthylation de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	102
2.3.2.3.	Halogénéation en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	102
2.3.2.3.1.	Préparation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	102
2.3.2.3.2.	Préparation de la 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	103
2.3.2.3.3.	Essais d'iodation de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	103
2.3.3.	Synthèse de dérivés de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	105
2.3.3.1.	Méthylation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	105
2.3.3.2.	Réduction de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	105
2.4.	Synthèse de 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-ones fonctionnalisées à partir de nitroanilines.....	106
2.4.1.	Synthèse de dérivés substitués sur la partie benzénique du pharmacophore.....	106
2.4.2.	Limites de la préparation de ces dérivés via cette nouvelle voie de synthèse.....	108
<b>3.</b>	<b>Etude électrochimique.....</b>	<b>109</b>
3.1.	Principe de la voltampérométrie cyclique.....	112
3.2.	Développement d'un modèle théorique prédictif des potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	115
3.3.	Résultats.....	117
3.4.	Discussion.....	118
3.4.1.	Présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire et influence sur le potentiel de réduction.....	118
3.4.2.	Effets de la substitution de la partie pyridone du pharmacophore sur les potentiels de réduction.....	120
3.4.3.	Effets de la substitution de la partie benzénique du pharmacophore sur les potentiels de réduction.....	121
<b>4.</b>	<b>Evaluation de l'activité biologique <i>in vitro</i> des molécules synthétisées.....</b>	<b>123</b>
4.1.	Evaluation de la cytotoxicité sur une lignée humaine.....	124
4.2.	Evaluation de l'activité antileishmanienne.....	126
4.3.	Evaluation de l'activité anti- <i>Trypanosoma</i> .....	129
4.4.	Influence des potentiels de réduction et de la lipophilie sur l'activité antileishmanienne.....	131
4.4.1.	Influence des potentiels de réduction et de la lipophile sur l'activité antileishmanienne.....	131
4.4.2.	Relation entre l'activité anti- <i>Trypanosoma</i> et les potentiels de réduction.....	133
4.5.	Bilan des RSA.....	134
<b>5.</b>	<b>Recherche du mécanisme d'action antiparasitaire.....</b>	<b>136</b>

5.1.	Evaluation biologique sur des souches de <i>L. donovani</i> qui surexpriment les nitroréductases de <i>Leishmania</i> (NTR1 et NTR2).....	136
5.2.	Evaluation biologique sur des souches de <i>T. b. brucei</i> qui surexpriment la nitroréductase de <i>Trypanosoma</i> (NTR1).....	137
6.	<b>Etudes in vitro du potentiel pharmaceutique de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one</b> .....	137
6.1.	Evaluation de la mutagénicité et de la génotoxicité.....	137
6.2.	Etudes pharmacocinétiques in vitro.....	139
6.2.1.	Stabilité microsomale.....	139
6.2.2.	Fixation à l'albumine.....	140
7.	<b>Conclusion</b> .....	141
<b>Partie expérimentale du chapitre 3</b>		<b>144</b>
1.	<b>Données générales</b> .....	<b>144</b>
1.1.	Chromatographie sur couche mince.....	144
1.2.	Points de fusion.....	144
1.3.	Spéctrométrie par RMN.....	144
1.4.	Spéctrométrie de masse haute-résolution.....	144
1.5.	Micro-ondes.....	144
1.6.	Diffractions des rayons X.....	144
1.7.	Mesure des potentiels de réduction.....	145
2.	<b>Partie Chimie</b> .....	<b>145</b>
	Préparation de la 8-nitroquinoléine (1).....	145
	Préparation de la 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one (2).....	146
	Préparation du <i>N</i> -(2-Nitrophényl)-acétamide (3).....	146
	Préparation de la 7-amino-8-nitroquinoléine (4).....	147
	Préparation de la 7-acétylamino-8-nitroquinoléine (5).....	148
	Préparation de la 2-chloro-4-méthyl-8-nitroquinoléine (6).....	148
	Préparation de la 2-chloro-4-méthyl-6-nitroquinoléine (7).....	148
	Préparation de la 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (8).....	149
	Préparation de la 4-bromométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (9).....	150
	Préparation de la 4-hydroxyméthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (10).....	150
	Préparation de la <i>N</i> -Boc- 2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine (11).....	151
	Préparation de la 4-{{2-( <i>N</i> -boc-2-aminoéthoxy)éthoxy}éthyl}aminométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (12).....	151
	Préparation de la 4-{{2-(2-aminoéthoxy)éthoxy}éthyl}aminométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (13).....	152
	Préparation de la 2,4-dibromo-8-nitroquinoléine (14).....	153
	Préparation de la 4-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (15).....	153
	Préparation de la quinoléin-2(1H)-one (16).....	154
	Préparation de la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one (17).....	155
	Préparation de la <i>N</i> -méthylquinoléin-2(1H)-one (18).....	155
	Préparation de la 2-chloro-5-nitroquinoléine (19).....	156
	Préparation de la 2-chloro-8-nitroquinoléine (20).....	156
	Préparation de la 5-nitroquinoléin-2(1H)-one (21).....	156
	Préparation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one (22).....	157
	Préparation de la 2-méthoxy-8-nitroquinoléine (23).....	157
	Préparation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (24).....	158
	Préparation de la 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (25).....	159
	Préparation de la 3-bromo-2-méthoxy-8-nitroquinoléine (26).....	159
	Préparation de la 8-amino-3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (27).....	160
	Préparation de l'acide 3-3'-diéthoxypropionique (28).....	161
	Préparation de la 2-nitro-3-méthoxyaniline (29).....	161
	Préparation de la 5-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one (30).....	162

Préparation de la 6-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (31).....	162
Préparation de la 7-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (32).....	163
Préparation de la 5-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (33).....	163
Préparation de la 6-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (34).....	164
Préparation de la 7-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (35).....	164
<b>3. Partie Biologie.....</b>	<b>164</b>
Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de <i>Leishmania infantum</i> .....	164
Evaluation de la cytotoxicité sur la lignée cellulaire HepG2.....	165
Evaluation de la mutagénicité <i>via</i> un test d'Ames.....	166
Evaluation de la génotoxicité <i>via</i> un test des comètes.....	166
<b>Chapitre 4 : Pharmacomodulation anti-<i>Trypanosomatidae</i> en position 3 du pharmacophore via des couplages pallado-catalysés.</b>	<b>167</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>167</b>
<b>2. Les couplages pallado-catalysés en chimie organique.....</b>	<b>168</b>
2.1. Les réactions pallado-catalysées de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira.....	179
2.2. Couplages pallado-catalysés en positions 3 et 4 des dérivés de quinoléin-2(1 <i>H</i> )-ones.....	171
<b>3. Etude des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira sur la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1<i>H</i>)-one.....</b>	<b>172</b>
3.1. Mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura.....	172
3.1.1. Mise au point du couplage de Suzuki-Miyaura.....	173
3.1.2. Application des conditions optimisées du couplage de Suzuki-Miyaura à une série de 19 acides (hétéro)arylboroniques.....	176
3.2. Mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura.....	178
3.2.1. Mise au point du couplage de Sonogashira.....	179
3.3. Analyse électrochimique des molécules obtenues par couplage pallado-catalysé.	183
<b>4. Evaluation de l'activité biologique <i>in vitro</i> des molécules synthétisées.....</b>	<b>184</b>
4.1. Evaluation de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2.....	184
4.2. Evaluation de l'activité antileishmanienne.....	186
4.3. Evaluation de l'activité anti- <i>Trypanosoma</i> .....	187
4.4. Bilan des RSA.....	189
4.4.1. Evaluation biologique sur des souches de <i>T. b. brucei</i> qui surexpriment la nitroreductase de <i>Trypanosoma</i> (NTR1).....	190
4.4.2. Etude du passage de la barrière hémato-encéphalique.....	191
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>193</b>
<b>Partie expérimentale du chapitre 4</b>	<b>195</b>
<b>1. Données générales.....</b>	<b>195</b>
<b>2. Partie Chimie.....</b>	<b>195</b>
Protocole général pour la préparation des composés 36-55.....	195
Préparation de la 8-nitro-3-phénylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (36).....	195
Préparation de la 3-(4-méthoxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (37).....	196
Préparation de la 3-(4-hydroxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (38).....	197
Préparation de la 3-(4-aminophényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (39).....	197
Préparation de la 3-(4-chlorophényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (40).....	198
Préparation de la 3-(4-fluorophényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (41).....	198
Préparation de la 8-nitro-3-(4-trifluorométhylphényl)quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (42).....	199
Préparation de la 8-nitro-3-(3-thiophène)-quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (43).....	199
Préparation de la 3-(2-furanyl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (44).....	200
Préparation de la 8-nitro-3-(3-pyridinyl)-quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (45).....	200
Préparation de la 8-nitro-3-(4-pyridinyl)quinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (46).....	201
Préparation de la 3-(4-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (47).....	201
Préparation de la 3-(3-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (48).....	202

Préparation de la 3-(2-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (49).....	202
Préparation de la 3-(4-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (50).....	203
Préparation de la 3-(3-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (51).....	203
Préparation de la 3-(2-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (52).....	204
Préparation de la 3-(4-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (53).....	204
Préparation de la 3-(3-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (54).....	205
Préparation de la 3-(2-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (55).....	205
Procédure générale pour la préparation des composés 56-58.....	206
Préparation de la 3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (56).....	206
Préparation de la 3-(3-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (57).....	207
Préparation de la 3-(2-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (58).....	208
Préparation de la 3-(4-carboxyphényl)-2-méthoxy-8-nitroquinoléine (59).....	208
Préparation de la 8-nitro-3-phényléthynylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (60).....	209
Préparation de la 8-nitro-2-phenylfuro[2,3- <i>b</i> ]quinoline (61).....	210
<b>3. Partie Biologie.....</b>	<b>211</b>
Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de <i>Leishmania infantum</i> .....	211
Evaluation de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires HepG2.....	212

## Chapitre 5 : Étude de pharmacomodulation anti-kinétoplastidés en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one. 213

<b>1. Introduction.....</b>	<b>213</b>
<b>2. Travaux de synthèse.....</b>	<b>214</b>
2.1. Préparation de dérivés trifluorométhylés en position 6.....	214
2.1.1. Synthèse de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	214
2.1.2. Fonctionnalisation de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	215
2.1.2.1. Synthèse de la 3-chloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	215
2.1.2.2. Préparation de la 3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	215
2.1.3. Synthèse de dérivés de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	216
2.1.3.1. Nitration de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	216
2.1.3.2. Synthèse de la 3-chloro-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	216
2.1.3.3. Préparation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	216
2.1.3.4. Méthylation de dérivés de 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	217
2.1.3.4.1. Méthylation de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	217
2.1.3.4.2. Méthylation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	217
2.1.4. Réduction de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	218
2.2. Halogénations en position 3 et 6 du pharmacophore.....	218
2.2.1. Essais de bromation de la quinoléin-2-(1 <i>H</i> )-one.....	218
2.2.2. Bromation de la 8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	219
2.2.2.1. Optimisation de la réaction.....	219
2.2.2.2. Mécanisme réactionnel postulé.....	220
2.2.3. Préparation de la 3,6-dichloro-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	221
2.2.4. Préparation de la 6-bromo-3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	221
2.3. Couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura sur la 3,6-dibromoquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	222
2.3.1. Réaction de monocouplage de Suzuki-Miyaura en position 3.....	222
2.3.2. Déprotection de la 6-bromo-3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one.....	222
2.3.3. Réaction de dicouplage de Suzuki-Miyaura en position 3 et 6.....	223
2.4. Étude électrochimique.....	224
<b>3. Evaluation de l'activité biologique in vitro des molécules synthétisées.....</b>	<b>226</b>
3.1. Évaluation de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2.....	227
3.2. Évaluation de l'activité antileishmanienne.....	228
3.3. Évaluation de l'activité anti- <i>Trypanosoma</i> .....	230
3.4. Bilan des RSA.....	232
<b>4. Évaluation du potentiel pharmaceutique des molécules de cette série.....</b>	<b>233</b>

4.1.	Recherche du mécanisme d'action antiparasitaire.....	233
4.2.	Évaluation de la génotoxicité.....	234
4.3.	Études pharmacocinétiques <i>in vitro</i> .....	235
4.3.1.	Stabilité microsomale.....	235
4.3.2.	Fixation à l'albumine.....	236
4.3.3.	Test du franchissement de la barrière hémato-encéphalique.....	236
5.	<b>Conclusion</b> .....	237
<b>Partie expérimentale du chapitre 5</b>		<b>239</b>
1.	<b>Données générales</b> .....	<b>239</b>
2.	<b>Partie Chimie</b> .....	<b>239</b>
	Préparation de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (62).....	239
	Préparation de la 3-chloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (63).....	240
	Préparation de la 3,8-dichloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (64).....	240
	Préparation de la 3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (65).....	241
	Préparation de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (66).....	242
	Préparation de la 3-chloro-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (67).....	243
	Préparation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (68).....	244
	Préparation de la 2-méthoxy-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléine (69).....	244
	Préparation de la 3-bromo-2-méthoxy-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléine (70).....	245
	Préparation de la 8-amino-3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (71).....	246
	Préparation de 3,6,8-tribromoquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (72).....	247
	Préparation de la 3,6-dibromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (73).....	248
	Préparation de la 6-bromo-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (74).....	249
	Préparation de la 3,6-dichloro-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (75).....	250
	Préparation de la 6-bromo-3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (76).....	250
	Préparation de 6-bromo-3-(4-carboxyméthylphényl)-8-nitroquinolin-2(1 <i>H</i> )-one (77).....	251
	Préparation de la 6-bromo-3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (78).....	252
	Préparation de la 3,6-(4-carboxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (79).....	253
	Préparation de la 3,6-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1 <i>H</i> )-one (80).....	254
3.	<b>Partie Biologie</b> .....	<b>255</b>
	Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de <i>Leishmania infantum</i> .....	255
	Evaluation de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires HepG2.....	256
	Evaluation de la génotoxicité via un test des comètes.....	256
<b>Conclusion générale</b>		<b>258</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>264</b>



## Introduction Générale

Les maladies tropicales négligées (MTN) sont des pathologies historiquement délaissées par la communauté internationale et qui touchent les personnes à faibles revenus dans les régions tropicales et subtropicales. Ces maladies sont aujourd'hui endémiques dans plus de 150 pays et affectent près d'un milliard de personnes à travers le monde. Parmi les 17 MTN répertoriées par l'OMS, les infections dues à des protozoaires flagellés occupent une place centrale avec 1,3 millions de nouveaux cas et plus de 40.000 décès chaque année. Appartenant à la famille des *Trypanosomatidae*, *Leishmania sp* est responsable des leishmanioses tandis que *Trypanosoma brucei sp* et *Trypanosoma cruzi* sont respectivement les agents pathogènes de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) et de la Maladie de Chagas (MC).

A ce jour, la chimiothérapie reste la principale arme pour lutter contre ces maladies, mais aucun traitement convenable n'est actuellement disponible pour les populations touchées en raison de restrictions d'usage importantes. Une efficacité contestable, une voie d'administration nécessitant généralement une hospitalisation, des effets indésirables importants ou l'apparition de parasites résistants sont tout autant de critères appelant au développement de nouvelles molécules antiparasitaires. De surcroît, seules deux nouvelles molécules sont aujourd'hui développées en essais cliniques contre ces maladies, ce qui souligne l'urgence de découvrir de nouvelles entités chimiques aux mécanismes d'action novateurs.

Si l'utilisation de molécules nitroaromatiques comme agents anti-infectieux remonte au début des années 1950, un regain d'intérêt pour ces composés a été observé ces dernières années. Le fexinidazole, un dérivé de 5-nitroimidazole, est ainsi entré en essais cliniques contre la THA et la MC. Le mécanisme d'action de ces molécules nitrées implique une bioactivation par des nitroréductases (NTR) parasitaires qui, *via* des réductions successives du groupement nitro, vont générer des métabolites cytotoxiques à l'origine de la mort du parasite.

Cependant, si les structures cristallines de nombreuses nitroréductases bactériennes sont disponibles, il n'y a à ce jour aucune donnée cristallographique de nitroréductase parasitaire permettant l'accès à la structure tridimensionnelle de ces enzymes. De plus, l'analyse comparative des séquences en acides aminés d'une nitroréductase bactérienne et parasitaire a montré qu'elles présentent un faible taux d'homologie, ce qui est une limitation importante dans la conception rationnelle de nouvelles molécules antikinétoplastidés par des approches de modélisation moléculaire.

Notre équipe de recherche s'intéresse depuis plusieurs années à la synthèse et à l'identification de nouvelles molécules hétérocycliques aux propriétés antiparasitaires. Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité de travaux réalisés au laboratoire qui ont permis la découverte d'un nouveau hit antileishmanien : la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.



Le plan de cette thèse s'articule autour de 5 chapitres :

Le **chapitre 1** est consacré dans un premier temps à la définition du concept de « maladies tropicales négligées » (MTNs) ainsi qu'aux différentes stratégies qui ont été mises en place à l'échelle mondiale pour lutter contre celles-ci. Une attention particulière est portée aux maladies infectieuses dont l'agent pathogène est un kinétoplastidé, parasite protozoaire flagellé au cycle de vie complexe, du genre *Leishmania* ou *Trypanosoma*. Les aspects épidémiologiques, physiopathologiques et cliniques des leishmanioses et des trypanosomiasés sont aussi abordés. Dans un second temps, les traitements actuellement disponibles sur le marché contre la leishmaniose viscérale, la trypanosomiasé humaine africaine et la maladie de Chagas, sont détaillés, notamment *via* la mise en avant des rares avantages et des nombreuses limitations de ces molécules.

Le **chapitre 2** détaille tout d'abord les nouvelles entités chimiques actuellement en développement clinique et pré-clinique contre ces maladies infectieuses. Un intérêt particulier est ensuite accordé aux molécules nitroaromatiques et à leur utilisation en infectiologie. Dans un second temps, notre attention se porte sur les nitroréductases et la bioactivation des molécules nitroaromatiques par ces enzymes. Le mécanisme d'action antiparasitaire de ces molécules nitrées, faisant intervenir des nitroréductases présentes chez *Leishmania* et *Trypanosoma* est alors présenté. Enfin, les travaux précédemment réalisés dans ce domaine, au sein du laboratoire, sont présentés.

Le **chapitre 3** est consacré à la poursuite de l'étude du pharmacophore précédemment identifié, constitué d'un groupement nitro en position 8 et d'un motif lactame. Formulant l'hypothèse que cette série de molécules est bioactivée par des nitroréductases parasitaires, une approche rationnelle a été suivie, alliant l'étude de relations structure-activité et la mesure des potentiels de réduction. La synthèse de 35 molécules a ainsi été réalisée *via* la modification de la partie pyridone du pharmacophore à partir de 2-chloroquinoléines, ou de la partie benzénique depuis des nitroanilines. Des analogues *O*-méthylés de ces molécules ont aussi été préparés afin d'étudier le rôle de la fonction lactame sur les potentiels de réduction et l'activité antiparasitaire. Une étude par diffraction des rayons X a également aidé à la compréhension du pharmacophore antileishmanien. Par ailleurs, en croisant les valeurs de potentiels de réductions mesurés et les activités antileishmaniennes, une valeur seuil de potentiel a pu être déterminée. Enfin, l'introduction d'un groupement volumineux et lipophile en position 3 du cycle a permis l'identification d'un nouveau hit antikinétoplastidés, actif à la fois contre *Leishmania* et *Trypanosoma*. Si cette molécule est mutagène comme de nombreux autres nitrohétérocycles dont le fexinidazole, elle est non génotoxique sur des cellules humaines. De plus, sa stabilité en présence de microsomes hépatiques en fait également un bon candidat pour une évaluation *in vivo*

Le **chapitre 4** présente des études de pharmacomodulation anti-kinétoplastidés en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one. L'introduction d'autres groupements volumineux et lipophiles en cette position a été réalisée *via* des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira, après une optimisation des conditions réactionnelles. Ainsi, les meilleures conditions identifiées pour le couplage de Suzuki-Miyaura ont été appliquées à une gamme d'acides (hétéro)arylboroniques menant à la synthèse de 24 molécules originales. Le couplage de Sonogashira a permis d'isoler un dérivé portant un groupement alcynyle en position 3, mais à cause de son instabilité et de la formation d'un second sous-produit lors de cette réaction nous avons choisi d'abandonner le développement de cette série. Par ailleurs, l'analyse électrochimique de ces nouvelles molécules a montré que l'introduction d'un groupement aryle en position 3 du noyau avait peu d'effet sur les potentiels de réduction. Enfin, l'évaluation biologique de ces dérivés a permis d'identifier un nouveau hit sélectif de *Trypanosoma* qui présente une meilleure solubilité en milieu aqueux et un profil de cytotoxicité amélioré. De plus, il n'est que partiellement bioactivé par la nitroréductase de *Trypanosoma*, ce qui ouvre la voie à un nouveau mécanisme d'action antiparasitaire. Cependant, sa faible capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique, un paramètre clé pour le traitement de la THA, appelle à de nouveaux travaux de pharmacomodulation anti-kinétoplastidés.

Le **chapitre 5** est consacré à des études de relations structure-activité en position 6 du pharmacophore. En effet, nous avons identifié lors des chapitres précédents que cette position semble présenter un intérêt particulier dans le développement de molécules anti-*Trypanosoma*. Ainsi, une série de 19 nouvelles molécules a été synthétisée *via* l'introduction de groupements électroattracteurs en position 6 du noyau et des meilleurs groupements identifiés lors des études précédentes en position 3. Au cours de ce travail de synthèse organique, des réactions d'halogénéation sélective et de dihalogénéation du pharmacophore ont été mises au point. La préparation de dérivés dibromés a ensuite permis d'introduire un ou deux groupements aryles sur la structure *via* des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura. Par ailleurs, l'analyse électrochimique de ces nouvelles molécules a montré que l'introduction d'un groupement électroattracteur en position 6 du pharmacophore avait un effet important sur les potentiels de réduction. Finalement, l'évaluation biologique des molécules de cette série a permis d'identifier 2 molécules hit anti-*Trypanosoma*. Leurs génotoxicités, leurs stabilités microsomaes et leurs capacités à franchir la barrière hémato-encéphalique ont été étudiées, faisant de ces composés des candidats prometteurs en vue de futures études *in vivo* sur un modèle de THA.

Ce travail de thèse a fait appel à la collaboration entre différentes équipes spécialisées en chimie, pharmacocinétique, parasitologie ou toxicologie.

Les travaux de synthèse organique ont été effectués au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de Toulouse (UPR CNRS 8241), dans l'équipe K « Agents anti-infectieux Moléculaires et Macromoléculaires » dirigée par le Pr Pierre Verhaeghe. Certaines analyses de RMN ont été réalisées

par le Dr Christian Bijani au service de Résonance magnétique nucléaire du LCC, dirigé par le Dr Yannick Coppel. Les mesures de potentiels de réduction par voltampérométrie cyclique ont été effectuées par le Dr Alix Sournia-Saquet et M. Alain Moreau au service d'électrochimie, dirigé par le Dr Alix Sournia-Saquet. Les analyses par diffraction des rayons X ont été réalisées par le Dr Laure Vendier au service de Diffraction des rayons X du LCC, dirigé par le Dr Laure Vendier.

Les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution ont été effectuées par Mme Catherine Claparols, Mme Nathalie Martins-Froment, Mme Valérie Bourdon et Mr Eric Leroy au service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie de Toulouse (FR2599).

Les évaluations biologiques sur la forme amastigote de *Leishmania infantum* et sur la lignée humaine HepG2 ont été réalisées sous la supervision du Dr Sandra Bourgeade-Delmas et du Pr Alexis Valentin au Laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le Développement (PHARMA-DEV) de Toulouse (UMR 152 IRD-UPS), dans l'équipe « Biocid » dirigée par le Dr Stéphane Bertani.

Le criblage sur les formes promastigote et amastigote intramacrophagique de *Leishmania donovani*, tout comme l'évaluation de la mutagénicité de nos meilleures molécules, ont été effectués par M. Sébastien Hutter et le Dr Michèle Laget au service de parasitologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université Aix-Marseille, dirigé par le Pr Nadine Azas.

L'évaluation antiparasitaire sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei* a été réalisée par Mme Clotilde Boudot à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Limoges, dans l'équipe « Neuroépidémiologie Tropicale » (UMR INSERM 1094), sous la direction du Dr Bertrand Courtioux.

Les expériences de bioactivation par les nitroréductases de *Leishmania* et *Trypanosoma* ont été réalisées par le Dr Susan Wyllie au sein de la Division of Biological Chemistry and Drug Discovery (Wellcome Trust Building, School of Life Sciences), au sein de l'équipe du Pr A. H. Fairlamb.

L'évaluation de la génotoxicité a été réalisée par le Pr Elisa Boutet au Laboratoire Toxalim de Toulouse (UMR 1331), dans l'équipe « COMICS », dirigée par le Dr Laurence Huc.

Les études pharmacocinétiques de stabilité microsomale et de fixation à l'albumine ont été effectuées à l'Institut Pasteur de Lille par Mme Catherine Piveteau et Mr Alexandre Biela, au sein de la plateforme de pharmacocinétique.

Enfin, l'évaluation du passage de la barrière hémato-encéphalique a été réalisée au Centre d'Etude et de Recherche du Médicament de Normandie (CERMN, EA 4258) par Mme Sophie Corvaisier et le Dr Marc Since, dans le service « Screening et Drugabilité », dirigé par le Pr Aurélie Malzert-Fréon

L'ensemble de ce travail de thèse a permis l'écriture de 3 publications :

- 1) J. Pedron, C. Boudot, S. Hutter, S. Bourgeade-Delmas, J.-L. Stigliani, A. Sournia-Saquet, A. Moreau, E. Boutet-Robinet, L. Paloque, E. Mothes, M. Laget, L. Vendier, G. Pratviel, S. Wyllie, A. H. Fairlamb, N. Azas, B. Courtioux, A. Valentin and P. Verhaeghe.

**Novel 8-Nitroquinolin-2(1H)-ones as NTR-bioactivated Anti-kinetoplastid Molecules: Synthesis, Electrochemical and SAR Study.**

*Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 135-152.

- 2) J. Pedron, C. Boudot, S. Bourgeade-Delmas, A. Sournia-Saquet, L. Paloque, M. Rastegari, M. Abdoulaye, H. El-Kashef, C. Bonduelle, G. Pratviel, S. Wyllie, A. Fairlamb, B. Courtioux, P. Verhaeghe and A. Valentin.

**Antitrypanosomal pharmacomodulation at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1H)-one scaffold using pallado-catalyzed cross coupling reactions.**

*ChemMedChem*, **2018**, *13*, 2217-2228.

- 3) J. Pedron, C. Boudot, S. Hutter, S. Bourgeade-Delmas, J.-L. Stigliani, A. Sournia-Saquet, E. Boutet-Robinet, L. Paloque, E. Mothes, M. Laget, L. Vendier, C. Bonduelle, G. Pratviel, S. Wyllie, A. H. Fairlamb, N. Azas, B. Courtioux, A. Valentin and P. Verhaeghe.

**Synthesis of nanomolar active antikinoplastid compounds, bioactivated by type I nitroreductases, in 6-substituted-8-nitroquinolin-2(1H)-ones series.**

Soumission à *ACS Infect. Dis.*

# CHAPITRE 1

## Les kinétoplastidés, des parasites responsables de maladies tropicales négligées.

# Chapitre 1 : Les kinétoplastidés, des parasites responsables de maladies tropicales négligées.

## 1. Les maladies tropicales négligées

### 1.1 Définition

Le terme de maladies tropicales négligées (MTNs) apparaît pour la première fois en 2003 (Peter J. Hotez, David Molyneux, et Alan Fenwick).<sup>1</sup> Ces membres du lobby MTN avaient pour ambition de mettre en lumière ce groupe de maladies alors que le sida, le paludisme et la tuberculose accaparaient jusque-là l'essentiel de l'attention de la communauté internationale. Historiquement, les MTNs regroupent des maladies qui touchent des populations à faibles revenus et qui sont endémiques dans des régions tropicales ou subtropicales, principalement en Afrique, en Asie ou aux Amériques. Elles sont ainsi négligées par la communauté internationale, tant au niveau politique qu'au niveau institutionnel, avec très peu de considération et donc d'investissements de la part des pays de l'hémisphère Nord et des grands groupes pharmaceutiques. En effet selon une étude réalisée entre 1975 et 1999 par P. Trouiller *et al.*,<sup>2</sup> et portant sur les 1393 nouvelles molécules mises sur le marché, il apparaît que seulement 9 molécules étaient destinées au traitement des maladies tropicales (hors paludisme et tuberculose), ce qui représente un ratio de 0,6%. De plus, si 2/3 de ces 1393 nouvelles molécules n'apportaient que très peu voire aucune avancée thérapeutique en comparaison avec celles déjà commercialisées, chacune des nouvelles molécules mise sur le marché pour les maladies tropicales négligées a apporté une vraie plus-value et a été incorporée dans la liste de l'OMS des médicaments essentiels. Les industries pharmaceutiques en sont partiellement responsables, car elles préfèrent développer des molécules capables de générer d'importants profits en ciblant des maladies qui touchent des personnes pouvant payer des traitements cliniques. Elles participent ainsi à l'émergence de ces maladies tropicales négligées.

En 2010, l'OMS décrit comme maladie tropicale négligée, toute maladie qui :

- est fortement liée à la pauvreté,
- affecte des populations vulnérables dans des régions tropicales qui manquent de considération au niveau international,
- n'est pas transmise rapidement et à grande échelle et donc ne représente pas une grande menace pour les pays de l'hémisphère nord,
- provoque de la discrimination et de la stigmatisation,
- a un poids important au niveau humain et économique,

<sup>1</sup> J. Smith et E. M. Taylor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004719.

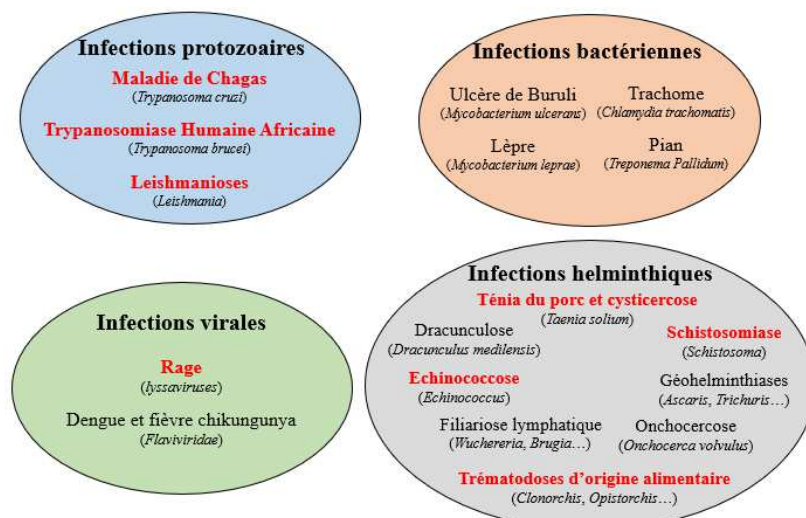
<sup>2</sup> P. Trouiller, P. Olliaro, E. Torreele *et al.*, *Lancet*, **2002**, *359*, 2188-2194.



- ne bénéficie pas d'investissements et de travaux en recherche et développement de la part de l'industrie pharmaceutique,
- peut théoriquement être contrôlée, réprimée voire éliminée.<sup>3</sup>

La pauvreté des populations concernées est un facteur clé ; dans ces régions les personnes vivent dans de mauvaises conditions sanitaires, avec un accès à l'eau potable et à la nourriture restreint et des systèmes de santé publique et d'accès aux traitements presque inexistantes. Ces conditions sont propices au développement et à la transmission de ces MTNs et des efforts doivent être réalisés pour protéger la santé de ces populations.<sup>4,5</sup>

En 2013, l'OMS a établi une liste de 17 maladies tropicales négligées répondant aux critères cités précédemment.<sup>6</sup> Cette liste est par ailleurs soumise à controverse, d'autres institutions comme « Le centre pour le contrôle et la prévention des maladies » (CDC) ou la « fondation Bill & Melinda Gates » faisant un recensement quelque peu différent de ces maladies.<sup>2</sup> La liste de l'OMS comprend des infections dues à des virus, des bactéries, des protozoaires et des helminthes, cette dernière catégorie étant la plus représentée (Figure 1). Parmi ces 17 MTNs, 8 sont considérées par l'OMS comme des Maladies zoonotiques négligées (MZNs), des maladies pouvant être transmises de l'animal à l'Homme (existence d'un réservoir animal de la maladie) par l'intermédiaire d'un vecteur ou non, et vice-versa. Elles sont représentées en rouge dans la figure ci-dessous.<sup>7</sup>



**Figure 1 :** Liste des 17 maladies tropicales négligées (MTNs) dont 8 maladies zoonotiques négligées (MZNs) répertoriées par l'OMS.

<sup>3</sup> Y. Jackson et N. Stephenson, *Global Public Health*, **2014**, 9, 995-1007.

<sup>4</sup> M. C. Baker, E. Mathieu, F. M. Fleming *et al.*, *Lancet*, **2010**, 375, 231-238.

<sup>5</sup> L. Conteh, T. Engels et D. H. Molyneux, *Lancet*, **2010**, 375, 239-247.

<sup>6</sup> Rapport OMS, **2013**, Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/).

<sup>7</sup> Conférence OMS, **2011**, Interagency meeting on planning the prevention and control of neglected and zoonotic diseases (NZDs), 5-6 Juillet, Genève, Suisse, [oie.int/doc/ged/D11558.PDF](http://www.who.int/doc/ged/D11558.PDF).



Pour estimer l'impact de ces maladies négligées dans le monde, les années de vie corrigées de l'incapacité (AVCI) sont utilisées, cette unité quantifie le nombre d'années en bonne santé perdues à cause d'incapacités ou de morts précoces liées à une maladie. Les MTNs représentaient 26 millions d'années en bonne santé perdues en 2010,<sup>8</sup> puis jusqu'à 48 millions d'années en 2014.<sup>9</sup> Ce chiffre non négligeable est très proche de celui de la tuberculose (49 millions) mais toujours inférieurs à celui du paludisme (83 millions) et du VIH/SIDA (82 millions). Les MTNs sont aujourd'hui endémiques dans presque 150 pays, elles touchent au moins 1 milliard de personnes dans le monde et sont responsables de 350.000 à 500.000 décès chaque année.<sup>10</sup> Ces chiffres sont toutefois à prendre avec précaution. En effet, les symptômes de ces différentes maladies ne sont pas spécifiques dans les stades précoces et entraînent de nombreuses erreurs de diagnostic. De plus, en prenant en compte à la fois les personnes qui n'ont pas accès à des systèmes de soins dans les pays les plus reculés et les personnes les plus pauvres touchées mais vivant dans les pays développés (par exemple aux USA), ces chiffres sont très probablement sous-évalués.<sup>11</sup>

Il y a donc un besoin urgent de lutter contre ces maladies tropicales négligées. Cependant, depuis quelques années, les mentalités sont en train d'évoluer et des efforts ont été réalisés avec la mise en place d'un plan d'action par l'OMS. L'objectif est clair : le contrôle, l'élimination (la réduction à 0 de la mortalité dans une région donnée) et l'éradication (la réduction à 0 de la mortalité dans le monde entier) de chacune de ces 17 maladies d'ici 2020.<sup>12</sup>

## 1.2 Objectifs et solutions mises en place dans la lutte contre les MTNs.

En 2012, l'OMS publie une feuille de route dans le combat contre ces maladies tropicales négligées avec des objectifs progressifs pour 2015 puis 2020. Ces objectifs résultent d'un travail initié en 2007 lors des premières rencontres des partenaires mondiaux sur les MTNs,<sup>13</sup> regroupant des institutions internationales comme des ONGs, des agences gouvernementales, des industries pharmaceutiques, des donateurs privés ou encore la Banque Mondiale. Cette réunion est un premier signal sur l'importance du contrôle de ces maladies et l'aide à apporter aux millions de personnes touchées. Elle a été suivie par d'autres rencontres comme la Déclaration de Londres en 2012, où les différents partenaires ont promis de gros investissements pour assurer l'approvisionnement en médicaments, la mise en place de

---

<sup>8</sup> C. J. Murray, T. Voz, R. Lozano *et al.*, *Lancet*, **2012**, 9859, 2197-2223.

<sup>9</sup> P. J. Hotez, M. Alvarado, M. G. Basàñez *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2014**, 7, e2865.

<sup>10</sup> A. S. Winkler, K. Klohe, V. Schmidt *et al.*, *Tidsskr Nor Lægeforen*, **2018**, 3, DOI: 10.4045/tidsskr.17.0678.

<sup>11</sup> P. J. Hotez *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2013**, 7, e2570.

<sup>12</sup> Rapport OMS, **2012**, Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases, a Road Map for Implantation, <http://www.emro.who.int/neglected-tropical-diseases/ntd-infocus/ntd-roadmap.html>.

<sup>13</sup> OMS, **2007**, Report of the first global partner's meeting on neglected tropical diseases: a turning point, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/partners\\_meeting/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/partners_meeting/en/).

partenariats pour venir en aide aux pays touchés et enfin le développement de programme de R&D ayant pour but de découvrir de nouveaux médicaments, vaccins ou encore méthodes de diagnostics.<sup>14</sup>

Les objectifs de l'OMS pour 2015 étaient d'éradiquer la dracunculose, d'éliminer l'onchocercose, la schistosomiase et la rage de certaines régions du globe et de stopper la transmission de la maladie de Chagas en Amérique du sud. Ces objectifs n'ont malheureusement pas été atteints pour la plupart et sont donc décalés à l'horizon 2020, ils sont résumés dans le tableau 1 avec des éliminations par région et des éradications prévues pour 11 maladies.

Maladie	Objectif d'élimination 2020
Rage	Asie du s-e et Pacifique ouest
Trachome	<b>Mondiale</b>
Trématodoses	<b>Eradication</b>
Lèpre	<b>Mondiale</b>
Maladie de Chagas	Arrêt de la transmission intra-domicile
HAT	<b>Mondiale</b>
Leishmaniose Viscérale	Sous-continent indien
Filiariose lymphatique	<b>Mondiale</b>
Onchocercose	Afrique
Schistosomiase	Pacifique Ouest et Amériques

**Tableau 1** : Feuille de route de l'OMS pour 2020 pour 11 des MTNs.<sup>12</sup>

Si une élimination à l'échelle mondiale est ciblée pour 5 maladies, on peut constater que l'élimination sera progressive pour la rage, la leishmaniose viscérale, l'onchocercose et la schistosomiase. La maladie de Chagas représente un cas particulier car avant de penser à l'éliminer, les efforts doivent être réalisés dans la limitation de la transmission de la maladie. Pour remplir ces objectifs, chaque acteur a eu un rôle très important. Dix grandes industries pharmaceutiques se sont engagées à faire don de 2 milliards de dollars de médicaments chaque année<sup>15,16</sup>, tandis que les ONGs s'assurent que ces médicaments arrivent à destination dans les pays concernés. La fondation Bill et Mélinda Gates a également réalisé un don de 1,2 milliard de dollars<sup>17</sup> tout comme les gouvernements américains et britanniques dont l'engagement dans la lutte contre ces maladies tropicales négligées a été très important, permettant l'apport de 700 millions de traitements par an.<sup>18</sup>

<sup>14</sup> C. A. Buscaglia, J. C. Kissinger et F. Aguero, *Trends Genet.*, **2015**, 31, 539-555.

<sup>15</sup> D. H. Molyneux, *Parasit Vectors*, **2012**, 5, 1-4.

<sup>16</sup> S. Bush, A. D. Hopkins, *Acta. Trop.*, **2011**, 120, S169-172.

<sup>17</sup> T. K. Mackey, B. A. Liang, R. Cuomo *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2014**, 27, 949-979.

<sup>18</sup> D. H. Molyneux, *Int. Health*, **2014**, 6, 172-180.

En 2012, l'OMS propose 3 stratégies principales à mettre en place à l'échelle mondiale pour lutter contre les maladies tropicales négligées : la chimioprévention, la prise en charge intensifiée des patients, le contrôle des vecteurs, le contrôle des hôtes intermédiaires (médecine vétérinaire) et l'amélioration des conditions de vie dans les régions les plus pauvres du monde.<sup>12</sup>

- 1) La chimioprévention consiste à administrer un médicament à une population pour diminuer son risque de contracter la maladie. La population à risque étant très importante dans le cas des MTNs, l'administration massive de médicaments est nécessaire. Elle repose sur la distribution à grande échelle de médicaments à bas prix (entre 0,30 \$ et 0,50 \$ par personne traitée), spécifiques de chaque maladie, sans réaliser un diagnostic individuel.<sup>19</sup> Cette stratégie a pour but de réduire fortement la population d'agents infectieux par l'administration, sans risque, d'une seule dose d'un médicament. Elle cible principalement 5 MTNs : le trachome, la filarirose lymphatique, l'onchocercose, la schistosomiase, et les géohelminthiases. Cependant il y a encore des progrès à faire dans la distribution et le contrôle de ces traitements. D'après une étude de la banque mondiale seulement 12% du budget alloué à la distribution de médicaments en Afrique ont atteint les personnes à risque.<sup>20</sup> Des problèmes de contrefaçon ont également été observés en Afrique et en Asie lors d'une étude de 2012 ; 1/3 des médicaments distribués ont échoué à l'analyse de pureté et 1/3 ont échoué à l'analyse de l'emballage du médicament.<sup>21</sup>
- 2) La chimioprévention n'est pas une stratégie adaptée aux maladies contre lesquelles il n'y pas de traitements efficaces ou qui nécessitent une plus grande expertise clinique (diagnostics complexes). C'est le cas pour les trypanosomiasés, les leishmaniosés, la lèpre ou encore l'ulcère de Buruli, qui n'ont pas obtenu le même niveau de ressources, bien que certaines de ces maladies puissent être mortelles en l'absence de traitement.<sup>22</sup> Cette deuxième stratégie proposée par l'OMS consiste à améliorer les systèmes de santé au niveau local pour une meilleure prise en charge des patients comprenant de meilleurs diagnostics, de meilleurs traitements et un personnel soignant aux connaissances cliniques et compétences techniques suffisantes. De gros investissements sont également nécessaires et devront être augmentés dans les prochaines années pour atteindre les objectifs fixés par l'OMS pour 2020.<sup>23</sup>

<sup>19</sup> J. P. Webster, D. H. Molyneux, P. J. Hotez *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **2014**, 369, e20130434.

<sup>20</sup> D. H. Molyneux, *Int Health*, **2014**, 6, 172-180.

<sup>21</sup> G. M. Nayyar, J. G. Bremen, P. N. Newton *et al.*, *Lancet Infect. Dis.*, **2012**, 12, 488-496.

<sup>22</sup> D. H. Molyneux, L. Dean, O. Adekeye *et al.*, *Parasitology*, **2018**, 16, 1-8.

<sup>23</sup> OMS, **2017**, Integrating neglected tropical diseases in global health and development, Genève, Suisse.

3) Le contrôle des vecteurs des maladies et des hôtes intermédiaires est un troisième point clé qui va de pair avec les deux stratégies précédentes. En effet, un grand nombre de MTNs sont vectorisées ou possèdent un réservoir animal et des progrès dans leur contrôle sont aujourd'hui critiques pour remplir les objectifs d'élimination de maladies comme la leishmaniose viscérale,<sup>24</sup> la trypanosomiase africaine<sup>25</sup> ou encore la maladie de Chagas<sup>26</sup>. Il existe aujourd'hui plusieurs moyens de lutte contre ces vecteurs tels que l'utilisation d'insecticides non nocifs pour l'environnement, des moustiquaires traitées avec des insecticides, l'amélioration des conditions de vie (eau potable, nourriture non contaminée, élimination de la végétation propice au développement des vecteurs...), l'introduction d'un compétiteur au vecteur pour réduire sa population ou encore la mise en place de campagnes informatives dans les zones les plus touchées.<sup>17</sup> En Afrique, l'apparition de vecteurs résistants aux insecticides<sup>27</sup> rend d'autant plus urgentes les recherches à ce sujet et une récente déclaration de l'OMS souligne l'augmentation de cette menace et appelle à des dons supplémentaires pour y faire face.<sup>28</sup>

En plus de ces 3 stratégies, le contrôle des maladies zoonotiques négligées (MZNs) est aussi primordial et l'OMS appelle à une approche « One Health » qui inclue médecine humaine, médecine vétérinaire ainsi que tout effort visant à améliorer l'environnement de ceux-ci (comme la sécurité alimentaire). Le but est de protéger les populations, les animaux et de réduire l'impact de ces maladies.<sup>29</sup> En Ouganda, cette dernière stratégie a déjà donné des résultats intéressants sur la trypanosomiase humaine africaine avec une réduction du nombre de cas suite à une campagne de chimiothérapie sur le bétail couplée à l'utilisation d'insecticides pour repousser le vecteur (ici la mouche tsé tsé).<sup>30</sup>

### 1.3 Premiers résultats et perspectives.

En 2018, quelques années après la mise en place de ces différentes stratégies par l'OMS et les autres grands acteurs de la lutte contre les maladies tropicales négligées, Peter J. Hotez présente les premiers résultats en comparant le nombre de cas de certaines MTNs en 1990 et en 2016 (Tableau 2).<sup>31</sup>

<sup>24</sup> M. Coleman, G. M. Foster, R. Deb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, 8573-8578.

<sup>25</sup> I. Tirados, J. Esterhuizen, V. Kovacic *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2015**, *9*, e0003822.

<sup>26</sup> K. Rosecrans, G. Martin-Cruz, A. King *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2014**, *8*, e2763.

<sup>27</sup> J. Hemingway, H. Ranson, A. Magill *et al.*, *Lancet*, **2016**, *387*, 1785-1788.

<sup>28</sup> OMS, **2017**, Global Vector Control Response 2017-2030, Genève, Suisse, <http://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/>.

<sup>29</sup> AVMA, **2009**, One health: A new professional imperative, Schaumburg, Etats-Unis, [https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth\\_final.pdf](https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf).

<sup>30</sup> S. C. Welburn, I. Beange, M. J. Ducrotoy *et al.*, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2015**, *21*, 433-443.

<sup>31</sup> P. J. Hotez, *Adv. Parasitol.*, **2018**, *100*, 29-38.

Maladie	Nombre de cas 1990 (Millions)	Nombre de cas 2016 (Millions)	Progression
Schistosomiase	195,36	189,77	- 3%
Filiariose lymphatique	44,14	29,38	- 33%
Onchocercose	24,13	14,65	- 39%
Trématodoses	59,08	74,72	+26%
Dracunculose	0,93	1,5x10 <sup>-5</sup>	-99,99%
Leishmaniose Cutanée	1,99	4,32	+ 117%
Leishmaniose Viscérale	0,48	0,12	- 75%
Maladie de Chagas	7,02	7,20	+ 3%
Trypanosomiase Humaine Africaine	0,062	0,007	- 89%

**Tableau 2 :** Evolution du nombre de cas de certaines MTNs entre 1990 et 2016.

On peut constater que la stratégie de chimioprévention avec une administration massive de médicaments a été efficace pour l'onchocercose ou la filiariose lymphatique, deux helminthiases. Le nombre de cas de leishmaniose viscérale et de trypanosomiase humaine africaine a également diminué grâce aux efforts de contrôle et d'élimination de ces maladies. Cependant on peut constater une forte augmentation des cas de leishmaniose cutanée et de trématodoses d'origine alimentaire avec des progressions respectives de 117% et de 26% entre 1999 et 2016. Cette hausse est en partie due à la chute des systèmes de santé et à la dégradation des conditions de vie en Afghanistan, en Syrie et en Iraq du fait de conflits armés.

Depuis quelques années, des changements sont observables au niveau mondial avec le réchauffement climatique, une urbanisation de plus en plus importante, ou les flux migratoires dûs aux conflits et à l'extrême pauvreté dans certains pays. Ces changements ont des conséquences directes sur le déplacement des maladies tropicales négligées depuis les pays en voie de développement vers les pays de l'hémisphère nord.<sup>32</sup> Ainsi l'augmentation des températures est peut-être déjà responsable du retour du paludisme en Italie et en Grèce<sup>33</sup> avec des conditions climatiques désormais propices au développement du vecteur de la maladie. Les flux migratoires ont quant à eux provoqués l'arrivée depuis l'Amérique du sud de la maladie de Chagas aux USA, au Canada et en Australie<sup>34</sup> tout comme l'apparition de cas de schistosomiasis en Corse depuis l'Afrique.<sup>35</sup>

Aujourd'hui, de nombreux efforts ont été réalisés par tous les acteurs de la lutte contre les maladies tropicales négligées. Ces efforts ont permis de traiter 1,1 milliard de personnes en 2015 et l'accès aux médicaments n'est plus un problème, même pour les régions les plus pauvres du monde.<sup>32</sup> Cependant pour atteindre les objectifs fixés par l'OMS pour 2020, il y aurait besoin de 300 millions de dollars supplémentaires chaque année et de 3 milliards de dollars en incluant la lutte contre les vecteurs de ces

<sup>32</sup> D. H. Molyneux, L. Savioli et D. Engels, *Lancet*, **2016**, 389, 312-325.

<sup>33</sup> P. J. Hotez, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2016**, 10, e0004243.

<sup>34</sup> E. E. Connors, J. M. Vinetz, J. R. Weeks *et al.*, *Acta Trop.*, **2016**, 156, 68-78.

<sup>35</sup> A. Berry, H. Moné, X. Iriart *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.*, **2014**, 20, 1595-1597.

maladies.<sup>36,37</sup> De nouveaux partenariats sont nécessaires, notamment avec la zone Europe et l'Asie, qui ne participent pas pour le moment à la lutte contre les MTNs, ce qui montre que ces maladies restent encore aujourd'hui négligées.

Par ailleurs, Research and Training in Tropical Diseases (TDR), un programme qui soutient le combat contre ces maladies tropicales et qui regroupe l'UNICEF (United Nations Children's Fund), l'UNDP (United Nations Development Program), la banque mondiale et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) souligne que, dans les prochaines années, la priorité doit être donnée aux maladies parasitaires telles que les trypanosomioses ou les leishmanioses.<sup>38</sup> En effet des recherches sont nécessaires pour améliorer le traitement de la trypanosomiose humaine africaine *via* un médicament administrable par voie orale et efficace sur tous les stades de la maladie. Les traitements de la maladie de Chagas et des leishmanioses sont également loin d'être idéaux à cause de leurs toxicités, de leurs modes ou de leurs durées d'administration.

## 2. Les Leishmanioses.

### 2.1 Epidémiologie.

Les leishmanioses sont des maladies tropicales négligées qui présentent le taux de morbidité et d'années de vie corrigées de l'incapacité (AVCI) les plus importants parmi les maladies parasitaires, après le paludisme et la schistosomiose.<sup>39</sup> Ces infections parasitaires, qui sévissent surtout dans les régions tropicales et subtropicales, sont endémiques dans près de 100 pays à travers le monde, incluant tous les continents sauf l'Océanie et l'Antarctique.<sup>40</sup> Avec entre 12 et 15 millions de personnes infectées dans le monde et 350 millions de personnes à risque, les leishmanioses représentent une menace loin d'être négligeable à l'échelle du globe.<sup>41</sup> Selon l'OMS, entre 900.000 et 1.000.000 de nouvelles personnes sont touchées chaque année et entre 20.000 et 30.000 décès liés à ces maladies sont également constatés. Environ 90% de ces nouveaux cas de leishmanioses appartiennent à seulement 13 pays : l'Afghanistan, l'Algérie, le Bangladesh, la Bolivie, le Brésil, la Colombie, l'Éthiopie, l'Inde, l'Iran, le Pérou, le Soudan du sud, le Soudan et la Syrie (Figure 2).<sup>42</sup>

<sup>36</sup> OMS, **2015**, Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Genève, Suisse.

<sup>37</sup> M. Booth et A. Clements, *Trends Parasitol.*, **2018**, 34, 272-282.

<sup>38</sup> TDR, **2012**, Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, [http://www.who.int/tdr/publications/research\\_priorities/en/](http://www.who.int/tdr/publications/research_priorities/en/) (Disponible le 24/05/2018).

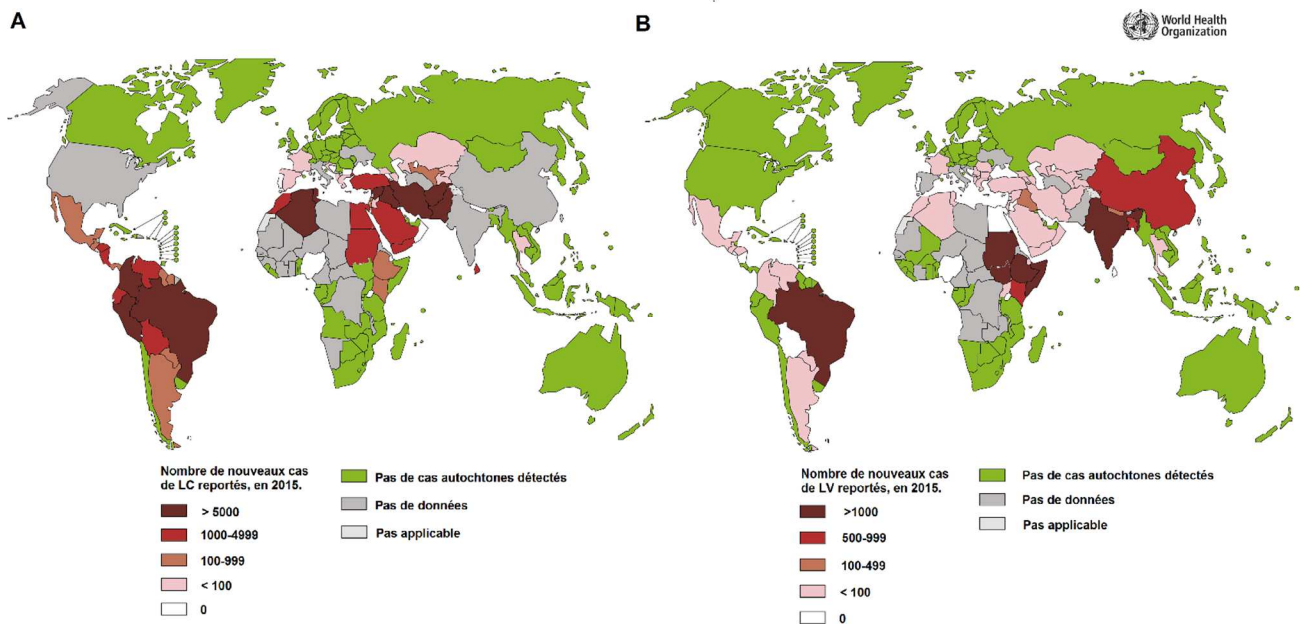
<sup>39</sup> J. M. Bethony, R. N. Cole, X. Guo *et al.*, *Immunol. Rev.*, **2011**, 239, 237-270.

<sup>40</sup> J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern *et al.*, *PLoS One*, **2012**, 7, e35671.

<sup>41</sup> E. Torres-Guerrero, M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud *et al.*, *F1000Res.*, **2017**, 6:750.

<sup>42</sup> OMS, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, mis à jour 03/2018, consulté 05/2018.





**Figure 2 :** Répartition géographique des nouveaux cas de A) Leishmaniose cutanée et B) Leishmaniose viscérale, en 2015.<sup>43</sup>

Les leishmanioses qui touchent majoritairement les personnes de l'hémisphère sud, sont des maladies vectorisées par un phlébotome femelle hématophage infecté. Parmi plus de 800 espèces de phlébotomes connues, 98 sont capables d'être porteuses de la maladie et de la transmettre à l'Homme.<sup>44</sup> Cet Arthropode mesure de 2 à 3 mm et appartient à la famille des *Psychodidae*, divisée en deux genres : *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (regroupant les Amérique et l'Océanie).<sup>45</sup> Le genre *Lutzomyia* comprend 90% des espèces pathogènes. Si en temps normal ces phlébotomes se nourrissent la nuit et préfèrent rester cachés dans des endroits sombres et humides pendant la journée, les récents changements climatiques et environnementaux modifient peu à peu ces habitudes.<sup>41</sup> Le réchauffement climatique va également provoquer l'arrivée de ces espèces pathogènes dans l'hémisphère nord et entraînera probablement la transmission des leishmanioses dans des régions dans lesquelles ces maladies ne sont pour le moment pas endémiques.<sup>46</sup>



**Figure 3 :** Images d'un phlébotome, vecteur de la maladie, et d'un enfant de 4 ans touché par la leishmaniose viscérale . Sources: © Insect Ecran 2015 et University of Georgia, College of Veterinary Medicine.

<sup>43</sup> OMS, <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>, consulté en 06/2018.

<sup>44</sup> D. Pace, *J. Infect.*, **2014**, 69, S10-S18.

<sup>45</sup> M. Maroli, M. D. Feliciangeli, L. Bichaud *et al.*, *Med. Vet. Entomol.*, **2013**, 27, 123-147.

<sup>46</sup> H. Aspöck, T. Geresdorfer, H. Formayer *et al.* *Wien Klin Wochenschr.*, **2008**, 120, 24-29.



## 2.2 *Leishmania*, un parasite au cycle de vie complexe.

### 2.2.1 Les différentes espèces de *Leishmania*

Les leishmanioses sont des maladies causées par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ce parasite appartient à l'ordre des Kinétoplastidés qui regroupe les protistes munis, à certains stades de leur développement, d'un flagelle leur conférant une mobilité. Ils sont caractérisés par la présence dans la mitochondrie d'un kinétoplaste, un réseau d'ADN circulaire dense.<sup>47</sup> Ils font partie de la famille des Trypanosomatidés qui comprend les protozoaires flagellés responsables de maladies chez l'Homme ou l'animal au même titre qu'un autre parasite, *Trypanosoma sp.*

Il existe aujourd'hui 18 espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'Homme décrites.<sup>48,49</sup> On peut les classer selon leur sous-genre *Leishmania*, présent à la fois dans l'ancien et le nouveau monde, ou *Vianna*, présent seulement dans le nouveau monde. Les principales espèces sont représentées dans le tableau 3 : on peut distinguer les espèces présentes seulement dans le nouveau monde (rouge), dans l'ancien monde (bleu) ou sur l'ensemble des continents (vert), cette dernière catégorie ne contenant que l'espèce *L. infantum*.<sup>50</sup>

Sous-genre	Espèce du parasite	Région
<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brésil, Bolivie, Vénézuéla.
	<i>L. donovani</i>	Afrique centrale, Moyen-Orient, Asie du Sud (Inde/Chine).
	<i>L. infantum</i>	Pourtour méditerranéen, Europe de l'Est, Moyen-Orient, Asie centrale, Amérique centrale et Amérique du Sud.
	<i>L. major</i>	Afrique du Nord, Afrique centrale, Moyen-Orient et Asie centrale.
	<i>L. mexicana</i>	Etats-Unis, Equateur, Vénézuéla, Pérou.
	<i>L. tropica</i>	Afrique du Nord, Afrique centrale, Moyen-Orient et Asie centrale.
<i>Vianna</i>	<i>L. braziliensis</i>	Amérique du Sud (Guatemala, Brésil, Bolivie, Pérou, Vénézuéla).
	<i>L. guyanensis</i>	Nord de l'Amérique du Sud.
	<i>L. lindenbergi</i>	Brésil
	<i>L. panamensis</i>	Amérique Centrale et Amérique du Sud
	<i>L. peruviana</i>	Pérou, Bolivie

**Tableau 3 :** Répartition géographique des principales espèces de *Leishmania*

<sup>47</sup> B. Zulfikar, T. B. Shelper et V. M. Avery, *Drug Discov. Today*, **2017**, 22, 1516-1531.

<sup>48</sup> M. Akhoundi, K. Kuhls, A. Cannet *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2016**, 10, e0004349.

<sup>49</sup> J. Shaw, F. Pratlong, L. Floeter-Winter *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2015**, 93, 552-558.

<sup>50</sup> D. Steverding, *Parasit. Vectors*, **2017**, 10:82, 1-10.

L'espèce *L. donovani* a été la première à être découverte suite aux travaux du pathologiste W. B. Leishman et du docteur C. Donovan, publiés en 1903. Leurs noms ont ainsi été donnés à ce nouveau parasite (*Leishmania donovani*) et ont été adoptés à l'échelle mondiale dès 1904. En 1908, le bactériologiste C. J. H. Nicolle constata la présence de la leishmaniose sur des enfants en Tunisie et nomma ce parasite *L. infantum*.<sup>49</sup> Par la suite, les noms des espèces de *Leishmania* ont majoritairement été donnés en fonction de la zone géographique dans laquelle ils sévissent comme *L. braziliensis*, *L. mexicana* ou encore *L. peruviana*. Aujourd'hui, de nouvelles espèces de *Leishmania* sont toujours amenées à être découvertes. En effet, l'urbanisation progressive amène l'Homme plus proche de territoires jusqu'ici inexplorés où des phlébotomes porteurs de nouvelles espèces de *Leishmania* sont présents.<sup>50</sup>



**Figure 4 :** Schéma et vue microscopique d'une leishmanie au stade promastigote. Source: Michael Abbey/Science Source, grossissement x400.

*Leishmania infantum* possède la caractéristique d'avoir un réservoir canidé. La leishmaniose canine est endémique dans plus de 70 pays (notamment sur le pourtour du bassin méditerranéen) et 2,5 millions de chiens souffrent de cette maladie.<sup>51</sup> Le diagnostic est rendu très difficile étant donné que les symptômes sont pour la plupart non spécifiques, or plus le diagnostic est réalisé tardivement et moins le chien a de chance de survivre. Bien qu'il existe des vaccins pour les protéger, ceux-ci ne proposent qu'une protection limitée avec des taux de 68,4% pour Canileish® et 71% pour Leish-Tec®.<sup>52</sup> Une fois qu'un chien est infecté par la piqûre du phlébotome, il reste infecté à vie malgré le traitement, ce qui représente un coût important pour le propriétaire et un réservoir constant pour la maladie.

### 2.2.2 Le cycle de vie de *Leishmania*.

*Leishmania* est une espèce de parasite dimorphique, au cycle de vie complexe faisant intervenir le vecteur (le Phlébotome) et l'hôte (l'Homme ou l'animal). Si pour la grande majorité des espèces, la transmission se réalise de mammifère à mammifère, sans distinction homme-animal (anthropozoonose), *L. donovani* et *L. tropica* ne se transmettent que d'Homme à Homme (anthroponose).<sup>53</sup> Dans le cas des anthropozoonose, le réservoir animal majoritaire du parasite est le chien, particulièrement pour *L. infantum*.

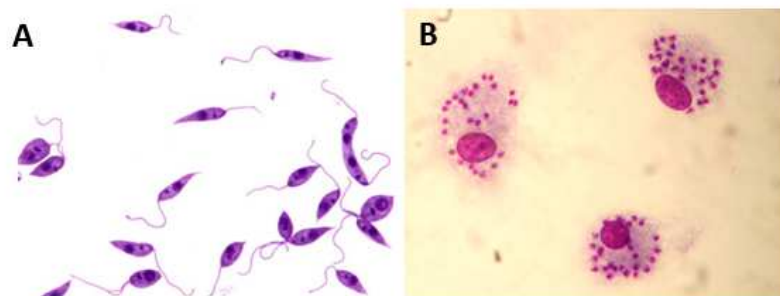
<sup>51</sup> I. Kaszak, M. Planellas et B. Dworecka-Kaszak, *Ann. Parasitol.*, **2015**, 61, 69-76.

<sup>52</sup> R. R. Ribeiro, M. S. M. Marques Michalick, M. D. da Silva *et al.*, *BioMed. Res. Int.*, **2018**, DOI : 10.1155/2018/3296893.

<sup>53</sup> C. Bern, J. H. Maguire et J. Alvar, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2008**, 2, e313.

Le cycle de vie du parasite fait intervenir 2 hôtes, mais également deux formes distinctes selon sa présence chez le phlébotome ou chez l'hôte (figure 3) : la forme promastigote et la forme amastigote.

- 1) La forme promastigote, flagellée extracellulaire qui mesure entre 15 et 20  $\mu\text{M}$  de long et qu'on retrouve chez l'insecte.<sup>54</sup> Cette forme promastigote possède 5 différents stades d'évolution à partir du moment où le vecteur va prendre un repas sanguin chez un hôte infecté. Suite à ce repas sanguin, les parasites se différencient en promastigotes procycliques au niveau de l'intestin postérieur et vont réaliser un premier cycle de multiplication. Ils vont ensuite se développer en nectomonades au niveau de l'intestin moyen, puis migrer vers la partie antérieure de l'intestin où ils évolueront en leptomonades et subiront leur second cycle de multiplication. Finalement ces leptomonades vont se différencier en haptomonades et en promastigotes métacycliques dans l'intestin thoracique. Ces promastigotes métacycliques sont la forme infectante, avec un plus petit corps et un flagelle plus long qui les rend adaptés à une transmission réussie du vecteur à l'hôte.<sup>55</sup>
- 2) Une forme amastigote, intracellulaire, mesurant de 3 à 5  $\mu\text{M}$  de long, non mobile, présente chez l'hôte. Cette forme circulaire est retrouvée dans les cellules du système phagocytaire mononucléé (macrophages, cellules dendritiques, fibroblastes ou neutrophiles) de l'hôte. Ces formes amastigotes sont capables de résister dans les macrophages et vont se multiplier à l'intérieur de ces cellules provoquant leur lyse, puis seront libérées et infecteront les cellules voisines perpétuant l'infection chez l'hôte.<sup>56</sup>



**Figure 5 :** Dimorphisme chez *Leishmania* : Forme promastigote (A) présente chez le vecteur (grossissement x100)<sup>57</sup> et amastigote (B) présente chez l'hôte (source : Wikimedia commons).

Le cycle de vie de ce parasite se déroule en deux phases (figure 4). Suite au repas sanguin du phlébotome, celui-ci va absorber des amastigotes intracellulaires présents chez l'hôte infecté. Ces amastigotes vont se différencier en promastigotes procycliques dans l'intestin du vecteur avant de se

<sup>54</sup> P. A. Bates, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2008**, 11, 340-344.

<sup>55</sup> S. Kamhawi, *Trends Parasitol.*, **2006**, 22, 439-445.

<sup>56</sup> M. Hommel, *J. Infect.*, **1999**, 39, 101-111.

<sup>57</sup> S. Gupta et Nishi, *Indian J. Med. Res.*, **2010**, 133, 27-39.

multiplier et d'évoluer en nectomonades, leptomonades, haptomonades et métacycliques en l'espace de 5 à 7 jours.<sup>53</sup> La seconde phase commence quand le phlébotome va réaliser un second repas sanguin chez un hôte sain, il va alors relâcher dans la circulation sanguine de l'hôte des promastigotes métacycliques en regurgitant sa salive. Ces promastigotes vont être phagocytés par les cellules du système immunitaire et se transformer en la forme amastigote, capable de résister à l'action lytique du phagolysosome. Ces amastigotes vont alors se multiplier à l'intérieur de ces cellules jusqu'à provoquer leur destruction. Une fois libérés, ces amastigotes vont être à nouveau phagocytés par les cellules voisines et ainsi propager l'infection. Le cycle continue lorsque le phlébotome va venir réaliser un nouveau repas sanguin chez un hôte sain désormais infecté.<sup>41</sup>

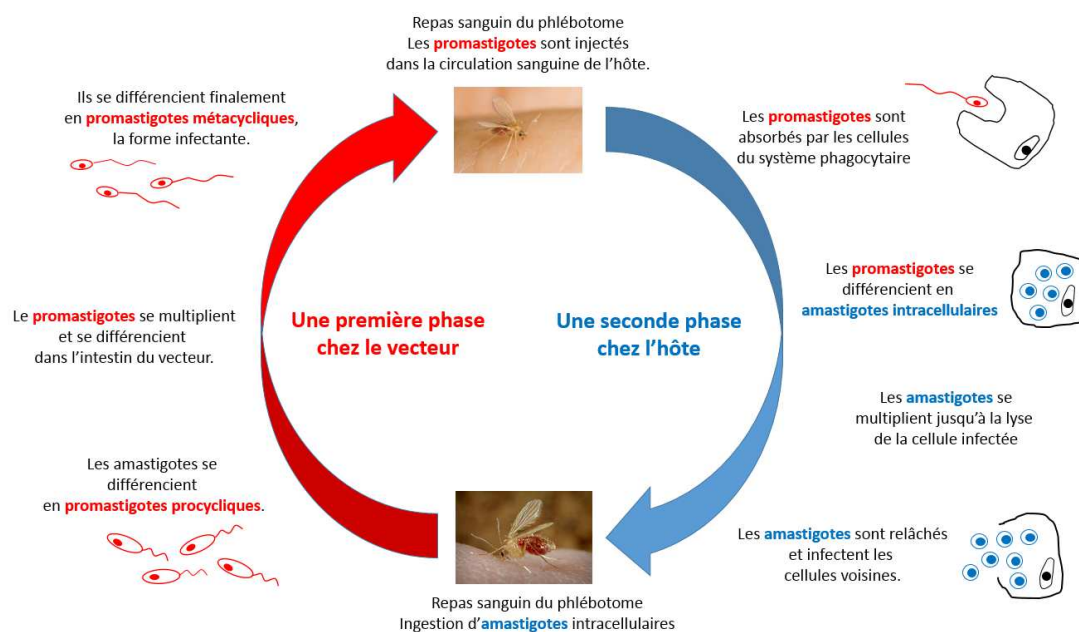


Figure 6 : Cycle de vie du parasite *Leishmania*, chez l'hôte et chez le vecteur.

## 2.3 Les différentes formes cliniques de la maladie.

Selon l'espèce de *Leishmania* qui infectera l'hôte et la nature de la réponse immunitaire de ce dernier, il existe différentes formes cliniques de la leishmaniose. On peut les classer en trois catégories : la leishmaniose cutanée (LC), la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) et la leishmaniose viscérale (LV).

### 2.3.1 La leishmaniose cutanée.

La leishmaniose cutanée (LC) est la forme la plus commune avec entre 700.000 et 1.2 millions de nouveaux cas chaque année, 95% d'entre eux au Moyen-Orient, en Amérique, en Asie centrale et au pourtour du bassin méditerranéen.<sup>58</sup> Les espèces principalement responsables de cette forme sont *L. major*, *L. tropica* et *L. aethiopica* dans l'ancien monde et *L. braziliensis*, *L. amazonensis* et *L. peruviana*

<sup>58</sup> A. J. Showler et A. K. Boggild, *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2015, 17, 489.

dans le nouveau monde.<sup>47</sup> La LC se caractérise par une lésion érythémateuse de 1 à 10 mm au niveau de la piqûre du phlébotome qui aura lieu sur les zones faciles d'accès telles que le visage, le cou ou les avant-bras. Cette lésion évolue ensuite en ulcères qui présentent un risque d'infection supplémentaire lorsqu'ils éclatent. La leishmaniose cutanée peut se soigner spontanément avec le temps selon l'espèce (entre quelques mois et quelques années) mais les dommages sur la peau comme des cicatrices seront irréversibles.<sup>59</sup> Enfin, malgré la guérison, des rechutes peuvent se produire des années après dans 33% des cas, on parle de *Leishmania recidivans*.<sup>60</sup>

Il existe une forme plus rare de leishmaniose cutanée, appelée leishmaniose cutanée diffuse (LCD). Elle intervient chez des personnes présentant un trouble du système immunitaire appelé anergie. Ces personnes ne sont plus capables de combattre les agents infectieux à cause de l'altération de l'immunité cellulaire qui empêche les globules blancs de reconnaître les parasites. Des cas ont été observés en Amérique du sud, en Ethiopie et au Kenya. Les premiers nodules sont le plus souvent présents au niveau du visage et avec le temps, se développeront au niveau des extrémités jusqu'à recouvrir la peau entière et les muqueuses dans les cas les plus extrêmes. Aucune guérison spontanée n'a été observée à ce jour pour cette forme de LC, qui évolue sur une durée supérieure à 20 ans.<sup>41</sup>

### 2.3.2 La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).

La leishmaniose cutanéomuqueuse est une forme plus rare, avec 35.000 nouveaux cas rapportés chaque année au Pérou, au Brésil et en Bolivie. Elle est quasiment absente de l'ancien monde.<sup>61</sup>

Cette maladie, principalement due à *L. braziliensis*, *L. panamensis* et *L. amazonensis*, s'attaque à la muqueuse nasopharyngée où les amastigotes vont migrer via la circulation sanguine et le système lymphatique. La propagation des parasites dans ces muqueuses est lente et mènera à la destruction de la cavité nasale et à l'endommagement des lèvres, du pharynx et du larynx, entraînant de graves mutilations et pouvant mener à la mort dans les cas les plus extrêmes.<sup>43</sup> Ces parasites sont sensibles à la chaleur, c'est pourquoi ils se localisent dans ces muqueuses, en particulier l'oreille externe et le nez, où la température est plus basse.<sup>62</sup>

### 2.3.3 La leishmaniose viscérale (LV).

La leishmaniose viscérale est la forme la plus grave de la maladie, elle est mortelle en l'absence de traitement. De 50.000 à 90.000 nouveaux cas de LV sont recensés chaque année et elle est à l'origine de 20.000 à 30.000 décès, 90% d'entre eux ayant lieu dans 7 pays : le Brésil, l'Ethiopie, l'Inde, le Kenya,

<sup>59</sup> P. R. Machado, E. M. Rosa, L. H. Guimaraes *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **2015**, 61, 945-949.

<sup>60</sup> R. Reithinger, J. Dujardin, H. Louzir *et al.*, *Lancet Infect. Dis.*, **2007**, 7, 581-596.

<sup>61</sup> J. A. Guerra, S. R. Prestes, H. Silveira *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2011**, 5, e980.

<sup>62</sup> P. D. Marsden et R. R. Nonata, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **1975**, 9, 309-326.

la Somalie, le Soudan du sud et le Soudan.<sup>62</sup> Cette forme de leishmaniose est principalement due à deux espèces : *L. donovani* touchant des personnes de tout âge dans l'ancien monde et *L. infantum* touchant majoritairement des enfants en bas âge et des personnes immuno-déprimées dans le monde entier. Après une période d'incubation de 3 à 8 mois, les premiers symptômes vont apparaître avec de la fièvre, une anémie, une perte de poids ainsi que des spléno- et hépatomégalias provoqués par la multiplication des parasites au niveau de ces organes.<sup>63</sup> En absence de traitement, la LV va être responsable de maladies multi-organes, d'hémorragies ou d'infections secondaires menant au décès du patient au bout de 2 à 3 ans.<sup>64</sup> Une inquiétante augmentation des cas de coinfection LV-HIV a également été observée sur le pourtour du bassin méditerranéen, en Afrique, en Asie et au Brésil. A titre d'exemple, dans la province de Bihar en Inde, 2,4% des patients de 14 ans ou plus infectés par la LV sont coinfectés par le VIH.<sup>65</sup>

Une autre complication de la leishmaniose viscérale est la leishmaniose cutanée post Kala-Azar (LDPKA) qui intervient chez 50% des patients traités contre la leishmaniose viscérale au Soudan et entre 5 et 10% en Inde.<sup>66</sup> Cette LDPKA se développe des mois ou des années après l'arrêt du traitement et est due à une réaction immunitaire contre les parasites *Leishmania* toujours présents au niveau de la peau du patient. Elle se caractérise par l'apparition de plaques ou de nodules qui diffèrent selon le patient et qui sont classés en 3 grades selon la gravité : Le grade 1 comprend des lésions sur le visage, le grade 2 sur le visage et la partie supérieure du corps et le grade 3 sur le corps entier.<sup>67</sup> La LDPKA nécessite un nouveau traitement pour éliminer définitivement le parasite chez le patient.

Maladie	Espèces de <i>Leishmania</i>	Principaux symptômes
Leishmaniose cutanée (LC)	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. braziliensis</i>	Lésion ou nodules au niveau de la piqûre pour la LC, sur le corps entier pour la LCD.
Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. amazonensis</i>	Destruction des muqueuses au niveau de la bouche, du nez et du système respiratoire.
Leishmaniose Viscérale (LV)	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	Anémie, fièvre, perte de poids, pâleur, spléno et hépatomégalie pouvant aller jusqu'au décès.

**Tableau 4 :** Récapitulatif des caractéristiques des 3 formes de leishmaniose.

La leishmaniose viscérale est la forme la plus grave de la maladie, mortelle en l'absence de traitement.

<sup>63</sup> M. M. Ashkan et K. M. Rahim, *Trop. Doct.*, **2008**, 38, 186-188.

<sup>64</sup> S. Collin, R. Davidson, K. Ritmeijer *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, 38, 612-619.

<sup>65</sup> S. Burza, R. Mahajan, M. Sanz *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **2014**, 59, 552-555.

<sup>66</sup> V. Ramesh, R. Singh et P. Salotra, *Trop. Med. Int. Health*, **2007**, 12, 848-851.

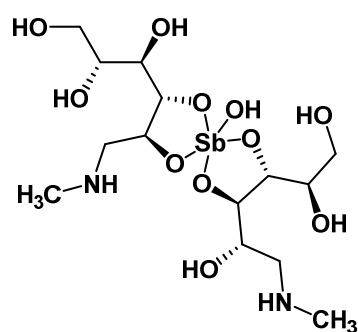
<sup>67</sup> P. Desjeux, R. H. Ghosh, P. Dhalaria *et al.*, *Parasit. Vectors*, **2013**, 6, 196.

## 2.4 Les traitements de la leishmaniose viscérale.

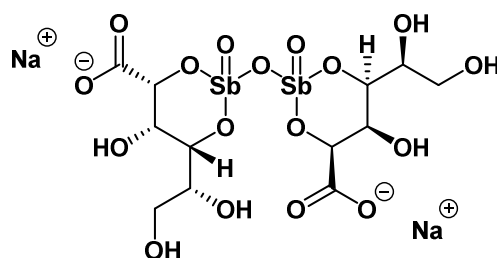
A ce jour, la chimiothérapie reste la principale arme pour lutter contre la leishmaniose viscérale. Elle a pour but d'éliminer le stade amastigote du parasite, présent dans les cellules du système immunitaire du patient. La molécule doit ainsi être capable de traverser la membrane cellulaire du macrophage en plus de celle du parasite, ce qui constitue une barrière supplémentaire pour que la molécule atteigne sa cible. La stratégie d'administration de masse de médicament est adaptée pour certaines maladies tropicales négligées mais, en raison de la toxicité, de la voie d'administration, des coûts élevés et de l'émergence progressive de résistances, cette stratégie n'est pas adaptée pour le traitement de la leishmaniose viscérale. Actuellement, 5 molécules sont sur le marché pour soigner la leishmaniose viscérale, chacune d'entre elle ayant de sévères inconvénients pour le patient : les dérivés pentavalents d'antimoine, la pentamidine, la paromomycine, l'amphotéricine B et la miltéfosine.

### 2.4.1 Les dérivés d'Antimoine.

Les dérivés d'antimoine (V) sont les premiers composés à avoir été utilisés contre la leishmaniose viscérale, à partir de 1920. Découverts par le professeur Bramachari, ils ont sauvé des millions de vie en Inde, ce qui lui a valu une nomination pour le Prix Nobel, en 1929.<sup>68</sup> Aujourd'hui deux d'entre eux sont toujours utilisés à travers le monde : l'antimoniote de Méglumine (Glucantime®, développé par Sanofi) et le Stibogluconate de Sodium (Pentostam®, développé par GlaxoSmithKline). Si les structures chimiques de ces deux médicaments demeurent ambiguës, le premier dérivé serait un complexe composé d'un cation  $Sb^{5+}$  et de deux molécules de méglumine tandis que le second serait composé de deux atomes de Sb complexés par deux molécules de gluconate de sodium. Le traitement recommandé pour ces deux produits est de 20 mg/kg/jour d'Antimoine pendant 28 à 30 jours, l'administration pouvant se faire par voie intraveineuse, intramusculaire ou intralymphatique.<sup>69</sup>



Antimoniote de Méglumine



Stibogluconate de Sodium

**Figure 7 :** Structure des deux dérivés d'antimoine utilisés contre la leishmaniose viscérale.

<sup>68</sup> U. N. Brahmachari, *Ind. Med. Gaz.*, **1922**, 57, 125-127.

<sup>69</sup> S. Sundar et A. Singh, *Ther. Adv. Infectious Dis.*, **2016**, 3, 98-109.



Ces deux dérivés d'antimoine sont toujours très utilisés à travers le monde notamment en Amérique du sud et en Afrique de l'est avec une efficacité globale variant de 35 à 95% selon la région.<sup>47</sup> Ces produits sont facilement disponibles pour les populations touchées dans les régions les plus pauvres, leur coût étant faible. Cependant, les dérivés d'antimoine sont responsables de sévères effets toxiques incluant notamment cardiotoxicité, néphrotoxicité, hépatotoxicité et pancréatites. De plus, l'apparition récente d'importantes résistances à ces dérivés en Inde (plus de 65% des patients dans la province de Bihar) oblige à l'utilisation d'autres molécules.<sup>70</sup>

Le mécanisme d'action de ces dérivés d'antimoine (V) n'est pas encore entièrement compris. Cependant ils agiraient comme une prodrogue avec la réduction de l'antimoine (V) en antimoine (III), plus actif et plus toxique.<sup>71</sup> Cette réduction peut être réalisée *via* des réductases spécifiques à *Leishmania* (ACR2<sup>72</sup>, une réductase d'antimoine, TDR1<sup>73</sup>, une réductase thiol-dépendante) ou *via* des thiols présents dans les macrophages (la glycylcystéine notamment).<sup>74</sup>

Les dérivés d'antimoine (III) qui passeraient du macrophage au parasite *via* le transporteur AQP1,<sup>75</sup> possèdent une grande affinité pour les ligands contenant un azote ou un soufre. Ils interagiraient donc avec les biomolécules de la cellule (protéines, peptides...) provoquant la fragmentation de l'ADN parasitaire puis la mort de la cellule par apoptose.<sup>76</sup> Enfin, comme évoqué dans la littérature, ces dérivés d'antimoine inhiberaient la trypanothione réductase, une enzyme spécifique au parasite les protégeant de la toxicité des métaux lourds et des dommages liés à l'oxydation.<sup>77</sup> Récemment il a été prouvé que les résistances aux dérivés antimoniés en Inde, sont liées à une mutation d'AQP1, empêchant l'entrée des dérivés d'antimoine (III) dans le parasite.<sup>78</sup> Une autre hypothèse émise est la présence d'arsenic dans l'eau en Inde, qui réduirait la sensibilité des parasites aux métaux lourds et serait responsable de ces fortes résistances aux dérivés d'antimoine.<sup>74</sup>

#### 2.4.2 La Pentamidine.

La pentamidine est une diamidine aromatique, composée d'un chaînon à 5 carbones, qui a été synthétisée pour la première fois dans les années 1930 par Yorke et ses collègues qui s'intéressaient alors à des molécules aux propriétés trypanocides.<sup>79</sup> Elle a été utilisée contre la leishmaniose viscérale

<sup>70</sup> S. Sundar, D. More, M. Singh *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **2000**, 31, 1104-1107.

<sup>71</sup> P. M. Loiseau et C. Bories, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2006**, 6, 539-550.

<sup>72</sup> Y. Zhou, N. Messier, M. Ouelette *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 37445-37451.

<sup>73</sup> H. Denton, J. C. McGregor, et G. H. Coobs, *Biochem. J.*, **2004**, 381, 405-412.

<sup>74</sup> C. Santos Ferreira, P. S. Martins, C. Demicheli *et al.*, *Biometals*, **2003**, 16, 441-446.

<sup>75</sup> A. Ponte-Sucré, F. Gamarro, J-C. Dujardin *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0006052.

<sup>76</sup> D. Sereno, P. Holzmüller, I. Mangot *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45, 2064-2069.

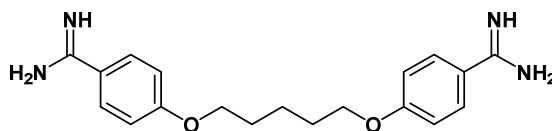
<sup>77</sup> M. L. Cunningham et A. H. Fairlamb, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 230, 460-468.

<sup>78</sup> S. Mandal, M. Maharjan, S. Singh *et al.*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2010**, 65, 496-507.

<sup>79</sup> W. Yorke, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1940**, 33, 463.



à partir des années 1980 dans les régions où les traitements habituels comme les dérivés d'Antimoine étaient devenus inefficaces, notamment en Inde. Cette molécule a obtenu son AMM en 1988 et est désormais commercialisée sous le nom de Pentacarinat® par Sanofi. Le traitement recommandé est de 3 mg/kg/jour pendant 4 jours, la voie d'administration étant principalement la voie intramusculaire.



**Figure 8 :** Structure de la pentamidine

L'efficacité de la pentamidine varie entre 36 et 96% selon la région concernée.<sup>47</sup> Son principal avantage est un traitement de courte durée. Cependant, cette molécule possède de fortes toxicités : abcès au niveau de la zone d'administration, nausées, myalgies, hypotension avec tachycardie et hyperglycémies chez les patients.<sup>46</sup> Récemment, son utilisation sur des patients co-infectés LV-HIV a montré des résultats intéressants avec des taux de survie sans rechutes de 71%, un an après le traitement.<sup>80</sup>

Son mécanisme d'action n'est, tout comme celui des dérivés d'antimoine, pas totalement élucidé. Sa cible principale serait le kinétoplaste présent dans la mitochondrie parasitaire. La pentamidine inhiberait la thymidylate synthétase et interférerait avec la synthèse de l'ADN parasitaire ce qui provoquerait des modifications morphologiques du kinétoplaste, de la mitochondrie et des ribosomes présents chez le parasite.<sup>81</sup> Un autre mode d'action possible est la perturbation de la biosynthèse des polyamines en inhibant notamment le transport d'arginine dans la mitochondrie.<sup>82</sup> Des résistances à la pentamidine ont également été reportées récemment. Les premiers résultats des études sur le mécanisme de ces résistances indiquent 3 possibilités majeures : des mutations au niveau du kinétoplaste présent dans la mitochondrie ou la présence de pompes d'efflux qui élimineraient la pentamidine des cellules parasitaires. La dernière hypothèse est une modification de la voie de biosynthèse des polyamines qui augmenterait la concentration en arginine dans la mitochondrie. Le potentiel de la membrane mitochondriale en serait affecté rendant plus difficile sa traversée par le médicament.<sup>83</sup>

<sup>80</sup> E. Diro, L. Lynen, R. Mohammed *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2015**, 9, e0004087.

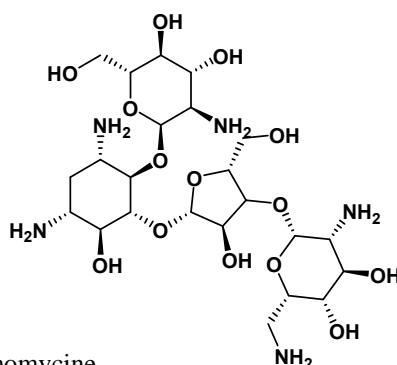
<sup>81</sup> M. Sands, M. A. Kron et R. B. Brown, *Rev. Infect. Dis.*, **1985**, 7, 625-634.

<sup>82</sup> M. Basselin, F. Lawrence et M. Robert-Gero, *Biochem. J.*, **1996**, 315, 631-634.

<sup>83</sup> G. Kaur et B. Rajput, *J. Parasitol. Res.*, **2014**, 2014, 726328.

### 2.4.3 La Paromomycine.

La paromomycine a été isolée pour la première fois en 1956 depuis la bactérie *Streptomyces rimosus* var. *Paromomycinus*.<sup>84</sup> C'est un aminoside à génine aminocyclitol de type 2-désoxystreptamine. Cet antibiotique à large spectre a été utilisé pour la première fois contre la leishmaniose viscérale en Inde, en 2006, après avoir vu son développement achevé par OneWorldHealth.<sup>85</sup> L'objectif principal était de trouver un nouveau composé pour contourner les problèmes de résistances apparus pour les dérivés d'antimoine et la pentamidine. Le traitement recommandé est de 15 mg/kg/jour pendant 21 jours *via* une administration par voie intramusculaire. Son efficacité varie selon la région où il est utilisé, en effet si la paromomycine est efficace sur plus de 94% des patients en Inde, en Afrique son efficacité est plus variable avec des valeurs allant de 46 à 85%.<sup>47</sup> La paromomycine est aujourd'hui considérée comme le traitement le moins cher sur le marché. Les principaux effets secondaires qui ont été observés chez les patients traités sont des douleurs au niveau du lieu d'administration, une ototoxicité réversible chez 2% des patients et une hépatotoxicité chez moins de 1% de ces mêmes patients.<sup>85</sup>



**Figure 9 :** Structure de la paromomycine.

Le mécanisme d'action antileishmanien de ce composé passerait par l'inhibition de la synthèse de macromolécules incluant l'ARN, ou de diverses protéines présentes dans le cytosol ou dans la mitochondrie du parasite.<sup>85</sup> Il agit plus particulièrement sur la dissociation des ribosomes cytoplasmiques ou mitochondriaux. La paromomycine a aussi un effet sur le métabolisme lipidique qui a un rôle important dans la constitution de la membrane du parasite. Elle va stimuler la synthèse de lipides polaires dans la membrane parasitaire qui va se rigidifier et perdre en stabilité contribuant à une action leishmanicide.<sup>86</sup>

<sup>84</sup> V. Wiwanitkit, *Ther. Clin. Risk. Manag.*, **2012**, 8, 323-328.

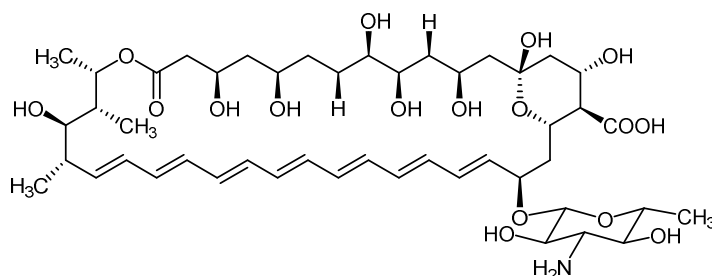
<sup>85</sup> R. N. Davidson, M. Den Boer et K. Ritmeijer, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2009**, 103, 653-660.

<sup>86</sup> M. Maarouf, F. Lawrence, S. Brown *et al.*, *Parasitol. Res.*, **1997**, 83, 198-202.

S'il n'y a pour le moment aucun cas de résistance à la paromomycine, des souches *in vitro* résistantes ont déjà été obtenues en laboratoire, laissant craindre une possible future résistance en clinique.<sup>87</sup> Ces résistances sont associées à une diminution de la pénétration du médicament dans le parasite. C'est pourquoi l'utilisation de la paromomycine est préférée en association avec les dérivés d'antimoine, qui présente une efficacité similaire au traitement par la paromomycine seule.<sup>88</sup>

#### 2.4.4 L'Amphotéricine B.

L'amphotéricine B, sous sa forme désoxycholate de sodium, est un anti-fongique à large spectre utilisé depuis les années 1950, produit par fermentation à partir de *Streptomyces nodosus*. C'est une molécule de la famille des polyènes macrocycliques lactoniques liée à un motif mycosamine. Elle a par la suite été utilisée pour traiter d'autres types d'infections comme la leishmaniose viscérale à partir de 1960.<sup>89</sup> C'est aujourd'hui le composé le plus actif contre cette maladie pour un traitement à 1 mg/kg/jour pendant 30 jours, *via* une administration par voie intraveineuse. Ce traitement permet d'atteindre un taux de guérison de 100%. Cependant ses effets toxiques sont importants avec une sévère néphrotoxicité, des risques d'hypokaliémie et une toxicité myocardique.



**Figure 10 :** Structure de l'amphotéricine B

C'est pourquoi des formulations à base de lipides ont été développées, la principale étant l'amphotéricine B liposomale (Ambisome®, Gilead Sciences). Cette formulation incorpore l'amphotéricine B dans une bicouche lipidique qui va lui permettre d'atteindre les parasites avant de se libérer, permettant une toxicité rénale moins importante. Cependant malgré une excellente efficacité (>96%) couplée à une toxicité mesurée, cette formulation présente d'autres inconvénients majeurs. En effet, elle est instable à la chaleur ce qui impose le respect de la chaîne du froid pour la conserver. De plus, ce traitement est très cher et donc non accessible à l'immense majorité des personnes touchées par la leishmaniose viscérale. D'autres formulations sont en cours d'études avec notamment l'option

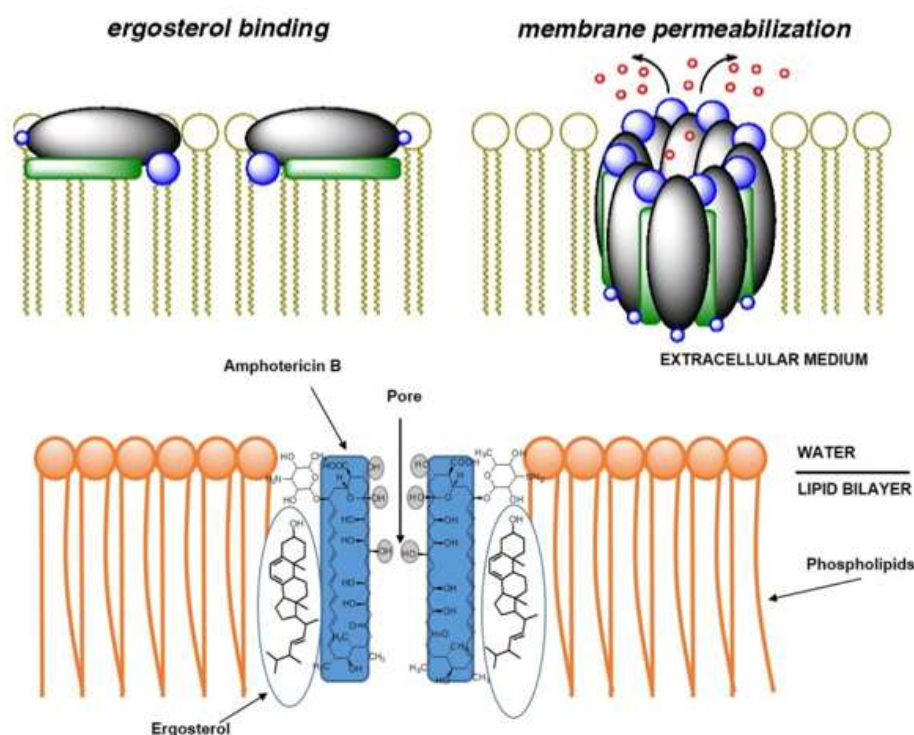
<sup>87</sup> M. Maarouf, M. T. Adeline, M. Solignac *et al.*, *Parasite*, **1998**, 5, 167-173.

<sup>88</sup> A. Musa, E. Khalil, A. Hailu *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2012**, 6, e1674.

<sup>89</sup> J. Alvar, S. Croft et P. Olliaro, *Adv. Parasitol.*, **2006**, 61, 223-274.

d'administrer une seule dose pour éviter les frais engendrés par une hospitalisation liée à la voie d'administration intraveineuse.<sup>69</sup>

Le mécanisme d'action de l'amphotéricine B cible la membrane du parasite, en lien avec sa structure chimique comprenant une partie hydrophobe (double liaisons conjuguées) et une partie hydrophile (composée de fonctions alcool, acide et amine). Les leishmanies ont une membrane contenant de l'ergostérol, tandis que les cellules de mammifères contiennent du cholestérol. L'amphotéricine B va se lier sélectivement à l'ergostérol de ces membranes, *via* sa partie hydrophobe, tandis que sa partie hydrophile va se replier, formant des pores à l'intérieur de la membrane du parasite. Ces pores vont provoquer la fuite d'éléments indispensables à la survie de la cellule (Figure 11).<sup>90</sup> Il a également été prouvé que l'amphotéricine B est capable d'induire un stress oxydant provoquant à terme la mort du parasite.<sup>72</sup> Pour le moment il n'existe presque pas de cas rapportés de résistances à l'amphotéricine B. Quelques cas ont tout de même été recensés en Inde, les mécanismes de résistance impliqueraient des changements dans la structure membranaire du parasite avec une diminution de la teneur en ergostérol rendant plus difficile la formation des pores. Les autres mécanismes détectés sont l'amélioration des systèmes de défense du parasite contre le stress oxydant et l'augmentation de l'efflux du médicament *via* une pompe membranaire MDR1.<sup>91</sup>



**Figure 11 :** Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.<sup>92,93</sup>

<sup>90</sup> H. Ramos, E. Valdivieso, M. Gamargo *et al.*, *J. Membr. Biol.*, **1996**, 152, 65-75.

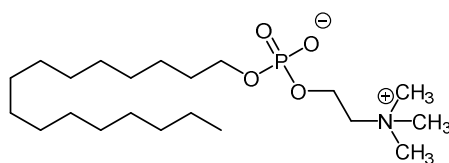
<sup>91</sup> N. Mbongo, P. M. Loiseau, M. A. Billion *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 352-357.

<sup>92</sup> D. S. Palacios, I. Dailey, I. E. Siebert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, 108, 6733-6738.

<sup>93</sup> A. Szebesczyk, E. Olshvang, A. Shanzer *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2016**, 328, 84-109.

### 2.4.5 La Miltéfosine

La miltéfosine (Impavido<sup>®</sup>, Paladin Therapeutics Inc.) a été développée dans un premier temps en tant qu'anti-cancéreux avant de devenir le premier traitement antileishmanien administrable par voie orale. C'est un double ester phosphorique d'alcool gras en C<sub>16</sub> et de choline. Depuis son enregistrement en Inde en 2002, il est devenu un médicament de première intention en lieu et place des dérivés antimoniés. Le traitement recommandé est de 2,5 mg/kg/jour pendant 28 jours. Il a montré un taux de guérison de 94% en Inde.<sup>47</sup> Malgré son efficacité et sa voie d'administration orale, la miltéfosine possède aussi des effets secondaires notables incluant la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et présente des propriétés tératogènes, contre-indiquant son usage chez la femme en âge de procréer.



**Figure 12 :** Structure de la miltéfosine, double phospho ester de choline et d'un alcool gras en C<sub>16</sub>.

Néanmoins, et probablement à cause de sa demi-vie supérieure à une semaine favorable à l'émergence de résistances, la miltéfosine est de moins en moins efficace avec des taux de rechutes en Inde et au Népal de respectivement 20% et 10%.<sup>94</sup> Ces données n'ont pas été directement associées pour l'instant à l'apparition de résistances mais à d'autres facteurs comme un changement de virulence des parasites. Le mécanisme d'action de la miltéfosine n'est pas encore élucidé mais quelques pistes ont été décrites et permettent une meilleure compréhension. Elle interférerait avec la voie de biosynthèse des phospholipides ce qui induirait à terme la dépolarisation de la membrane de la mitochondrie, une diminution intracellulaire du niveau d'ATP et une mort finale du parasite par apoptose.<sup>95,96,97</sup> La pénétration de la miltéfosine est médiée par un transporteur appelé LMT (*Leishmania* miltefosine transporter) et semble indispensable à une activité leishmanicide de la molécule. Récemment, deux cas cliniques de résistance à la miltéfosine ont été rapportés. Le principal mécanisme de résistance mis en jeu semble être une diminution de l'internalisation de la miltéfosine *via* des mutations du transporteur LMT notamment, ou une augmentation de l'efflux par différents transporteurs désormais surexprimés.<sup>75, 98, 99</sup>

<sup>94</sup> S. Rijal, B. Ostyn, S. Uranw *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **2013**, 56, 1530-1538.

<sup>95</sup> G. Barratt, M. Saint-Pierre-Chazalet, P. M. Loiseau *et al.*, *Curr. Drug. Metab.*, **2009**, 10, 247-255.

<sup>96</sup> J. R. Luque-Ortega et L. Rivas, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 1327-1332.

<sup>97</sup> C. Paris, P. M. Loiseau, C. Bories *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, 48, 852-859.

<sup>98</sup> K. Seifert, F. J. Perez-Victoria, M. Stettler *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2007**, 30, 229-235.

<sup>99</sup> E. Castanys-Munoz, J. M. Perez-Victoria, F. Gamarro *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, 52, 3573-3579.

### 2.4.6 Bilan des traitements disponibles contre la leishmaniose viscérale

Médicament	Voie d'administration	Avantages	Limites	Résistances
Dérivés d'Antimoine	IV, IM	Peu cher	Forte toxicité	> 65% en Inde
Pentamidine	IM	Traitement court	Peu efficace et toxique	Premiers cas de résistances rapportés
Paromomycine	IM	Peu cher	Pas efficace dans toutes les régions	Souches <i>in vitro</i> résistantes en laboratoire
Amphotéricine B liposomale	IV	Très efficace	Sensible à la chaleur et cher	De très rares cas en Inde
Miltéfosine	Orale	Voie orale	Tératogénicité	20% en Inde et 10% au Népal

**Tableau 5 :** Principales caractéristiques des traitements disponibles contre la leishmaniose viscérale.

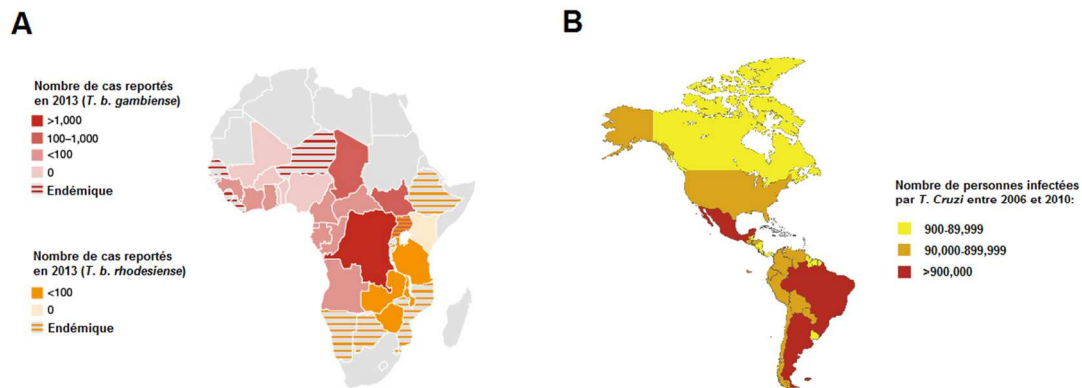
Il existe peu de médicaments sur le marché contre la leishmaniose viscérale et comme on peut le voir dans le tableau ci-dessus (Tableau 5), ils présentent tous des restrictions d'usage importantes. L'apparition de résistances appelle à la découverte de nouvelles molécules aux mécanismes d'action novateurs et à l'utilisation plus systématique de bi-thérapies, afin de limiter l'extension. Dans certains pays comme l'Inde ou le Népal cette maladie a toujours un impact considérable sur les populations, il est donc très important de continuer les recherches pour atteindre l'objectif de l'OMS : éliminer la maladie en Inde pour l'horizon 2020 dans un premier temps, puis des autres régions où elle sévit par la suite. Cet objectif est en bonne voie avec une diminution du nombre de cas de 75% depuis le lancement du programme en 2005. Cependant les efforts doivent être poursuivis, et de nouvelles molécules actives identifiées, pour éliminer cette maladie définitivement.

## 3. Les trypanosomias.

### 3.1 Epidémiologie.

Les trypanosomias font également partie des maladies tropicales négligées recensées par l'OMS. Ces maladies parasitaires représentent plus de 130 millions de personnes à risque, réparties en Afrique, Amérique centrale et Amérique du sud où elles sont endémiques dans plus de 40 pays. Selon les estimations les plus récentes de l'OMS, plus de 40.000 nouveaux cas et plus de 12.000 décès sont

constatés chaque année.<sup>100,101</sup> Cependant, les régions touchées étant dans des zones rurales, parfois au cœur de pays en conflit, ces chiffres sont très probablement sous-estimés.<sup>102</sup> Les trypanosomiases comprennent la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil, qui est endémique seulement en Afrique et la Trypanosomiase Américaine ou maladie de Chagas, qui touche exclusivement les Amériques (Figure 10). Si ces deux maladies sont provoquées par un parasite du genre *Trypanosoma*, elles diffèrent par de très nombreux aspects dont la nature du vecteur, l'espèce des parasites, les signes cliniques, les traitements...



**Figure 13 :** Distribution **A)** du nombre de cas de Trypanosomiase Humaine Africaine en 2013<sup>103</sup> et **B)** du nombre de personnes infectées par la Maladie de Chagas entre 2006 et 2010.<sup>6</sup>

## 3.2 La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA).

### 3.2.1 Épidémiologie

La THA est une maladie tropicale négligée qui sévit en Afrique Sub-Saharienne, allant de la Gambie à l'ouest de l'Afrique jusqu'au Mozambique à l'est. C'est un missionnaire écossais, David Livingston, qui a observé pour la première fois en 1852 le lien entre la maladie du sommeil et la présence de la mouche tsé-tsé, désormais connue comme le vecteur de la maladie. Puis en 1895, David Bruce, microbiologiste écossais, découvrit l'existence des trypanosomes (en tant qu'agent pathogène de la Trypanosomiase Humaine Africaine) et le nom de *Trypanosoma brucei* leur fût ensuite donné.<sup>104</sup> Le nom de *Trypanosoma* dérive du grec trypano (tarrière) et soma (corps) et leur fût donné en raison de

<sup>100</sup> OMS, [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)), mis à jour le 18/02/2018, consulté le 30/05/2018.

<sup>101</sup> OMS, [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)), mis à jour le 01/02/2018, consulté le 30/05/2018.

<sup>102</sup> P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau *et al.*, *Lancet*, **2017**, 390, 2397-2409.

<sup>103</sup> OMS, [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs529/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs529/en), consulté en 06/2018.

<sup>104</sup> D. Steverding, *Parasit. Vectors*, **2008**, 1:3.



leur mouvement circulaire.<sup>105</sup> La THA a provoqué de très grandes épidémies au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, tuant des centaines de milliers de personnes entre 1896 et 1906. La dernière épidémie remonte aux années 1990 avec plus de 500.000 cas rapportés<sup>106</sup>, provoquée par une période de guerre et de famine couplée avec une diminution de la surveillance de la maladie à cause de systèmes de santé défaillants. Aujourd'hui, moins de 3000 nouveaux cas sont rapportés chaque année grâce aux efforts conjoints de l'OMS, d'ONGs et de partenaires privés comme Sanofi et Bayer.<sup>100</sup> Cependant, ce chiffre est probablement sous-estimé en raison de la difficulté d'accès à certaines régions rurales. Des études vont dans ce sens et indiquent qu'en 2007, plus de 18.000 personnes étaient touchées par la THA au Congo, soit deux fois plus que le chiffre annoncé par l'OMS.<sup>107</sup>

La THA est transmise par la piqure d'une mouche tsé-tsé infectée. Il existe à ce jour 31 espèces de cette mouche décrites qui appartiennent au genre *Glossina*, elles sont classées en 3 catégories selon l'endroit où elles se développent.<sup>108</sup> Le sous-genre *Nemorhina* est présent en Afrique de l'ouest et centrale, dans des lieux humides proches de sources d'eaux. Il inclue les principaux vecteurs de la THA avec *G. palpalis palpalis*, *G. palpalis gambiensi* et *G. fuscipes*. *G. Morsitans* et *G. Austenina* sont les deux autres sous-genres avec des présences majoritaires en Afrique de l'est, *G. Morsitans* étant une autre espèce majoritaire vectrice de la maladie.<sup>109</sup> Une grande différence avec les phlébotomes responsables de la leishmaniose est que les mouches tsé-tsé mâles sont tout comme les femelles, hémato-phages. Ces mouches tsé-tsé ne peuvent survivre qu'à des températures comprises entre 16 et 38 °C avec un taux d'humidité supérieur à 50%, ce qui limite leur diffusion dans l'hémisphère Nord notamment. Enfin, cet insecte qui peut mesurer jusqu'à 1,5 cm ne sera infecté par le parasite à la suite d'un repas sanguin que dans 2 à 5% des cas, ce qui en fait un vecteur peu efficace.<sup>110</sup>



**Figure 14 :** Mouches tsé-tsé, vecteur de la trypanosomiase humaine africaine. Source : © Cirad / J. Janelle et <http://www.slateafrique.com/>.

### 3.2.2 *Trypanosoma*, un parasite au cycle de vie complexe.

*Trypanosoma* est un parasite extracellulaire appartenant à la famille des Trypanosomatidés. Ces parasites, qui mesurent de 20 à 30 µM de long et 2 à 5 µM de large, comprennent une grosse

<sup>105</sup> J. Willinsky, *Emerg. Infect. Dis.*, **2006**, 12, 1473.

<sup>106</sup> M. P. Barrett, *Lancet*, **1999**, 353, 1113-1114.

<sup>107</sup> D. Mumba, E. Bohorquez, J. Messina *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2011**, 5, e1246.

<sup>108</sup> F. N. Wamwiri et R. E. Changasi, *Biomed. Res. Int.*, **2016**, 2016:8.

<sup>109</sup> J. S. Franco, P. P. Simarro, A. Diarra *et al.*, *Clin. Epidemiol.*, **2014**, 6, 257-275.

<sup>110</sup> D. H. Molyneux, *Insect Science and its Application*, **1980**, 1, 39-46.

mitochondrie contenant un kinétoplaste et un flagelle qui lui en confère la mobilité.<sup>102</sup> Il existe de nombreuses espèces de *Trypanosoma* mais seulement 3 sont responsables de la Trypanosomiase Humaine Africaine, chacune avec des caractéristiques différentes (Tableau 6). Chez l'homme, seules *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense* sont pathogènes. L'explication vient du fait que les parasites de la famille *Trypanosoma* responsables des Trypanosomiasés animales (*T. brucei brucei* par exemple) sont très sensibles à des facteurs trypanolytiques présent dans le sérum humain (TLFs), qui vont tuer les parasites et empêcher l'infection. Seulement *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* ont développé des résistances à ces facteurs trypanolytiques et ne seront donc pas détruit par l'hôte après infection.<sup>111</sup>

Espèce de <i>Trypanosoma</i>	Région	Réservoir	Nombre de cas
<i>T. brucei brucei</i>	De l'Afrique de l'ouest à l'Afrique du sud	Animaux domestiques et sauvages (chiens, porcs, bétail...)	Non pathogène pour l'homme, bon modèle de laboratoire.
<i>T. brucei gambiense</i>	Afrique de l'ouest Afrique centrale	Humain, affecte très peu les animaux	98% des cas de THA dont 86% uniquement en R. D. Congo
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Afrique de l'est Afrique du sud	Animaux domestiques et sauvages, affecte l'homme par accident	2% des cas dont 82% en Ouganda et Malawi

**Tableau 6 :** Principales caractéristiques des espèces de *Trypanosoma brucei*.

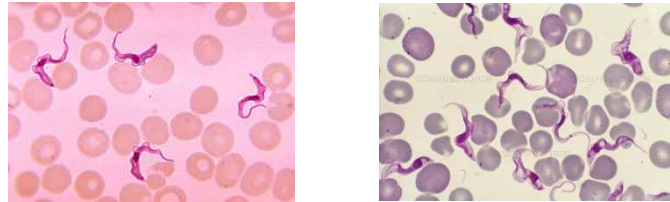
La trypanosomiase animale africaine (TAA) est également due à ces parasites et principalement à *T. vivax*, *T. congolense* et *T. brucei*. Elle s'attaque aux troupeaux de bétail, de moutons, de chèvres, de porcs et de chameaux ce qui est un problème majeur pour le développement agricole, l'agriculture étant la principale ressource des pays africains touchés par ces maladies. L'autre point critique est que ces animaux infectés forment un réservoir de la maladie qui augmente les chances de transmission à l'homme *via* le vecteur. Il n'existe pas de traitement idéal, la plupart étant toxiques et n'éliminant pas les possibilités de rechutes.<sup>112</sup>

*Trypanosoma*, au même titre que *Leishmania*, possède un cycle de vie complexe partagé entre un vecteur (la mouche tsé-tsé) et un hôte (Mammifère) comme indiqué dans la figure 16. Suite au repas sanguin de la glossine chez un hôte infecté, celle-ci va absorber des trypomastigotes sanguins qui, une fois dans l'intestin du vecteur, vont se différencier en trypomastigotes procycliques puis se diviser par scissiparité. Ils vont alors passer dans le proventricule, une structure de l'appareil digestif de la glossine,

<sup>111</sup> P. Capewell, N. J. Veitch, C. M. Turner *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2011**, 5, e1287.

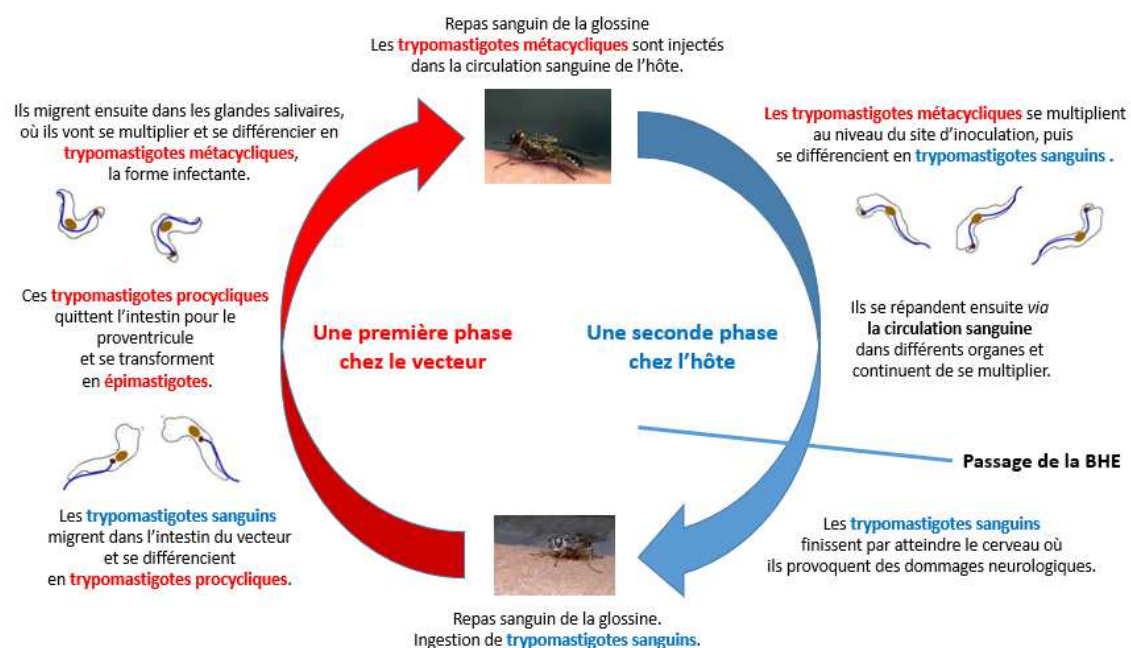
<sup>112</sup> F. Giordani, L. J. Morrison, T. G. Rowan *et al.*, *Parasitology*, **2016**, 143, 1862-1889.

où ils se transforment en épimastigotes. Finalement, les parasites vont rejoindre les glandes salivaires de la glossine par l'œsophage où ils vont se multiplier à nouveau et évoluer en trypomastigotes métacycliques, la forme infectante de la maladie.<sup>113</sup> Sur la totalité des parasites absorbés au départ par la glossine, seuls 2 à 5% vont atteindre le stade métacyclique.<sup>114</sup>



**Figure 15:** *Trypanosoma brucei brucei* trypomastigotes. Source : © Wikimedia Commons et © 2008 Jan Votýpk

Lors d'un repas sanguin chez un hôte sain, la glossine infectée va alors lui transmettre sous la peau cette forme métacyclique *via* une piqûre. Les trypomastigotes métacycliques vont alors se développer au niveau du lieu d'inoculation et se transformer en trypomastigotes sanguins, une forme plus longue et plus mince plus à même de se déplacer efficacement dans le système de circulation sanguine de l'hôte. Ils vont alors se répandre dans les différents organes impliqués dans la circulation (cœur, foie, rein...) puis passer la barrière hémato-encéphalique où ils provoqueront des dommages importants.<sup>115</sup>



**Figure 16 :** Cycle de vie du parasite *Trypanosoma brucei*, chez l'hôte et chez le vecteur.

<sup>113</sup> N. A. Dyer, C. Rose, N. O. Ejeh *et al.*, *Trends Parasitol.*, **2013**, 29, 188-196.

<sup>114</sup> K. Vickerman, L. Tetley, K. A. Hendry *et al.*, *Biol. Cell.*, **1988**, 64, 517-524.

<sup>115</sup> K. Kristensson, W. Masocha, W. Bentivoglio *et al.*, *Handb. Clin. Neurol.*, **2013**, 114, 11-22.

### 3.2.3 Formes cliniques de la Trypanosomiase Humaine Africaine.

Les formes cliniques de la THA varient en fonction de la sous-espèce de *Trypanosoma brucei* et du stade de la maladie qui est le plus souvent hémolymphatique dans un premier temps puis méningoencéphalique dans un second temps. Les symptômes de la maladie sont proches entre une infection par *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*. La principale différence réside dans le fait que, si pour la première espèce citée, la maladie est chronique et peut durer jusqu'à 3 ans, pour le deuxième, la maladie est aiguë et peut provoquer la mort chez le patient en moins de 6 mois.<sup>116</sup> Les deux stades ont des caractéristiques très différentes :

- 1) Le stade hémolymphatique correspond au stade où le parasite est présent dans la circulation sanguine et dans la lymphe. Un trypanome de 3 à 4 cm apparaît sur le lieu de piqûre puis 1 à 3 semaines après des symptômes progressifs vont se développer chez les patients comprenant fièvre, maux de tête, problèmes cardiaques, hépatosplénomégalie ou lymphadénopathie caractéristique d'une infection par *T. b. gambiense*.<sup>117</sup>
- 2) Le stade méningo-encéphalique débute au moment où les parasites vont passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et affecter le système nerveux central (au bout de plusieurs semaines pour *T. b. rhodesiense* et au bout de quelques mois pour *T. b. gambiense*). Les symptômes vont regrouper de nombreux désordres neurologiques comme des troubles du comportement, des troubles du sommeil, des troubles d'élocution, des tremblements ou des hallucinations.<sup>118</sup> Les patients finissent par tomber dans le coma suite aux dégâts causés dans le cerveau, entraînant à terme la mort. Ce sont les troubles du sommeil qui sont les plus caractéristiques, donnant même leur nom à la maladie. Chez 74% des patients touchés par la THA, le rythme de sommeil va être complètement altéré avec des épisodes incontrôlables de sommeil pendant la journée et des insomnies pendant la nuit (inversion du rythme nyctéméral).

## 3.3 La maladie de Chagas.

### 3.3.1 Epidémiologie.

La maladie de Chagas, ou Trypanosomiase Américaine, est une maladie infectieuse qui touche les Hommes et certains mammifères d'Amérique latine et d'Amérique centrale. Elle est considérée avec la THA et la leishmaniose viscérale comme l'une des plus importantes maladies tropicales négligées. Cette maladie a été découverte en 1908 par un bactériologiste brésilien, Carlos Chagas, qui en disséquant une

<sup>116</sup> P. G. E. Kennedy, *Lancet Neurol.*, **2013**, 12, 186-194.

<sup>117</sup> V. Lejon, M. Bentivoglio et J. R. Franco, *Handb. Clin. Neur.*, **2013**, 114, 169-181.

<sup>118</sup> J. Blum, C. Schmid et C. Burri, *Acta. Trop.*, **2006**, 97, 55-64.

punaie observa la présence de trypanosomes dans son intestin. Son mentor s'appelant Oswaldo Cruz, il appela ce parasite *Trypanosoma Cruzi*. En 1909, Chagas fût le premier à faire le lien entre ce parasite et la maladie qui porte désormais son nom.<sup>119</sup> La Trypanosomiase américaine est endémique dans plus de 21 pays, tue plus de 12.000 personnes par an et menace 70 millions de personnes pour 5,7 millions de personnes infectées.<sup>120</sup> Ces chiffres sont, comme pour la THA, probablement sous-estimés, la difficulté étant ici le délai d'apparition des symptômes spécifiques à la maladie qui peut être supérieur à 10 ans post-infection. La trypanosomiase américaine est transmise par la piqure d'une punaise hématophage appartenant à la famille des Réduves et à la sous-famille des Triatomines. Si la plupart des 151 espèces de cette sous-famille peuvent être porteuses de cette maladie, les représentants majoritaires sont *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* et *Panstrongylus megistus*.<sup>119</sup> Ces insectes mesurent de 5 mm à 4,2 cm pour les plus gros, ils sont présents du sud des USA jusqu'à au nord de l'Argentine, vivant principalement dans les régions rurales, dans les fissures des murs constitués de boue ou sous les toits de chaume.<sup>121</sup>



**Figure 17 :** Triatomes, vecteurs de la maladie de Chagas. Source : © Wikimedia Commons et Université de recherche du centre universitaire McGill.

### 3.3.2 Le cycle de vie de *Trypanosoma Cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* est un protozoaire flagellé responsable de la maladie de Chagas chez l'Homme et chez l'animal. Ce parasite présente la particularité d'être une espèce très hétérogène avec de nombreuses variations génétiques et phénotypiques, ces différences ayant été associées à des zones géographiques, des symptômes, des espèces du vecteur et des niveaux de réponses aux traitements différents chez les patients touchés par cette maladie.<sup>122</sup> Les parasites *Trypanosoma cruzi* ont ainsi été classés en différents sous-groupes allant de TcI à TcVI en fonctions de leurs caractéristiques génétiques et autres critères précédemment cités.<sup>123</sup> Tout comme *trypanosoma brucei*, il appartient à la famille des trypanosomatidés et possède un cycle de vie particulier faisant intervenir 2 hôtes (l'insecte et l'homme ou l'animal) et 4 formes distinctes : trypomastigote, épimastigote, trypomastigote métacyclique et amastigote. Le cycle est présenté dans le schéma ci-dessous (figure 18).

<sup>119</sup> D. Steverding, *Parasit. Vectors*, **2014**, 7:317.

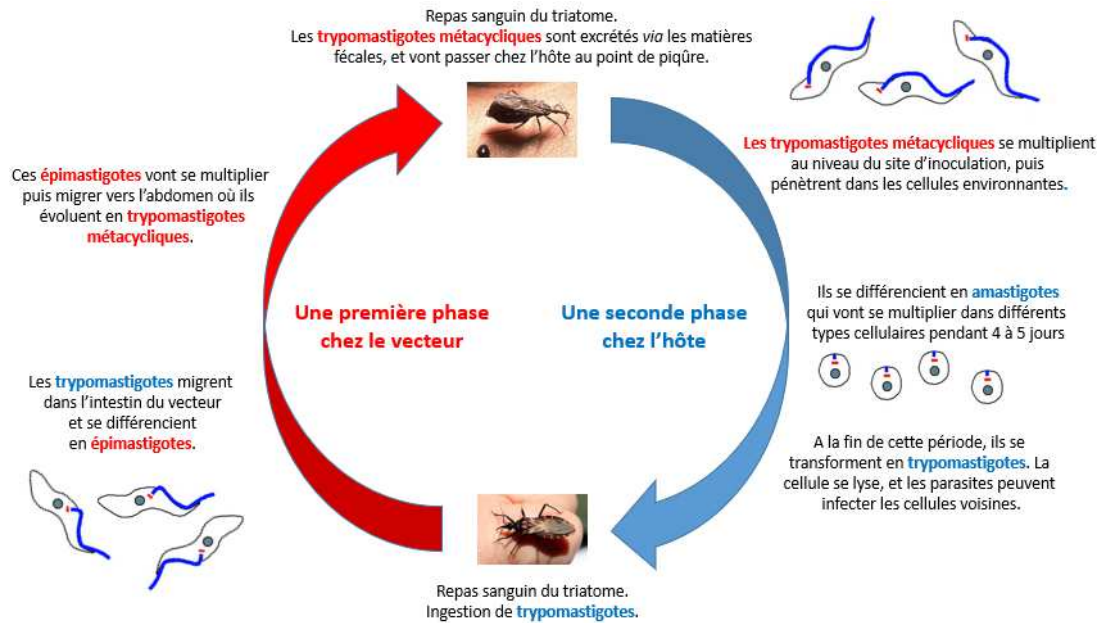
<sup>120</sup> J. A. Pérez-Molina et I. Molina, *Lancet*, **2017**, 391, 82-94.

<sup>121</sup> M. D. Caryn Bern, *N. Engl. J. Med.*, **2015**, 373, 456-466.

<sup>122</sup> B. Zingales, M. A. Miles, D. A. Campbell *et al.*, *Infect. Genet. Evol.*, **2012**, 12, 240-253.

<sup>123</sup> B. Zingales, S. G. Andrade, M. R. S. Briones *et al.*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2009**, 104, 1051-1054.





**Figure 18 :** Cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*.

Lors d'un repas sanguin chez un hôte infecté par *Trypanosoma Cruzi*, le triatome va ingérer des trypomastigotes et ainsi devenir vecteur de la maladie. Les trypomastigotes vont migrer vers l'intestin du vecteur où ils vont se différencier en épimastigotes, puis se multiplier. Ces épimastigotes migrent ensuite dans l'abdomen du triatome où ils évoluent en trypomastigotes métacycliques, la forme infectante de la maladie. Lors d'un second repas sanguin chez un hôte sain, le triatome va déposer, *via* ses excréments, des trypomastigotes métacycliques qui vont pénétrer dans la circulation sanguine au niveau de la zone de piqûre ou de muqueuses. Les trypomastigotes vont alors infecter les cellules présentes et se différencier en forme amastigote, une fois dans le cytoplasme de ces cellules. Les amastigotes vont doubler leur population toutes les 12 heures et se multiplier pendant 4 à 5 jours.<sup>121</sup> Une fois ce délai passé, ils se re-transforment en forme trypomastigote avant que la cellule ne se lyse, les libérant à nouveau et leur permettant d'infecter à nouveau les cellules environnantes.

### 3.3.3 Les symptômes de la maladie de Chagas.

La maladie de Chagas est une maladie qui possède trois phases successives : la première phase, dite phase aiguë, commence 1 à 2 semaines après l'infection. Les symptômes sont alors non spécifiques : fièvre, malaise, hépatosplénomégalie... des symptômes qu'on retrouve notamment dans la THA ou la leishmaniose. Dans certains cas, un chagome (un gonflement autour de la plaie) ou un signe de Romana, (un gonflement autour de l'œil, proche du point d'inoculation) peuvent apparaître (Figure 19).

Cette phase aiguë va alors durer de 4 à 8 semaines et ne sera mortelle que dans moins de 1% des cas, du fait du développement d'une méningo-encéphalite.<sup>124</sup>



**Figure 19 :** Photos d'un chagome et d'un signe de Romaña, caractéristiques de la maladie de Chagas. Source : campus.cerimes.fr et dna.kdna.ucla.edu.

La phase chronique commence alors ; elle est asymptomatique et une majorité des patients vivra avec cette infection sans rencontrer de problèmes particuliers. Cependant dans 30 à 40% des cas, l'infection va se développer et toucher des organes comme le cœur ou le colon, 10 à 30 ans après la piqûre du triatome.<sup>125</sup> Il y a deux types de complications :

- 1) La plus courante est la complication cardiaque qui intervient chez 14 à 45% des patients infectés. De nombreux signes cliniques vont pouvoir être observés indiquant différents types de cardiomyopathies. La mort intervient le plus souvent de façon brutale, à la suite d'une de la décompensation d'une insuffisance cardiaque.<sup>126</sup>
- 2) La complication gastro-intestinale est plus rare et survient dans 10 à 21% des cas. Les symptômes observés sont une perte de poids, des nausées, des constipations ou fécalomes, tous dûs à un gonflement du colon (appelé méga colon) ou de l'œsophage (méga œsophage), augmentant le risque de développer un cancer de l'œsophage.<sup>127</sup>

### 3.4 Les traitements contre la Trypanosomiase Humaine Africaine.

Aujourd'hui, la seule stratégie possible pour lutter contre la Trypanosomiase Humaine Africaine est la chimiothérapie. En effet, aucun vaccin n'est disponible en raison notamment de la variation antigénique du parasite. *Trypanosoma* est en effet capable de faire varier la nature des antigènes présents à sa surface, ce qui oblige le système immunitaire à induire une nouvelle réponse spécifique.<sup>128</sup> Tout comme pour la leishmaniose, la stratégie d'administration de masse n'est pas envisageable pour la THA, les médicaments présents sur le marché ayant une efficacité contestable, des voies d'administration nécessitant la présence de personnel soignant et surtout des effets secondaires importants. L'autre difficulté majeure est que ces médicaments ne sont pas actifs sur les deux sous espèces de *Trypanosoma*

<sup>124</sup> C. Bern, D. L. Martin et R. H. Gilman, *Adv. Parasitol.*, **2011**, 75, 19-47.

<sup>125</sup> A. Rassi Jr, A. Rassi et J. Marcondes de Rezende, *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **2012**, 26, 275-291.

<sup>126</sup> F. Salvador, B. Trevino, E. Sulleiro *et al.*, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2014**, 20, 706-712.

<sup>127</sup> R. B. Oliveira, L. E. Troncon, R. O. Dantas *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, **1998**, 93, 884-889.

<sup>128</sup> D. Horn, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2014**, 195, 123-129.



(*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*) et les deux stades de la maladie (le stade hémato-lymphatique et le stade méningo-encéphalique). A ce jour il existe 5 molécules actives contre la THA : la pentamidine et la suramine pour le traitement du premier stade et le mélarsoprol, l'eflornithine et le nifurtimox pour le traitement du second stade.

### 3.4.1 Les traitements du stade 1 de la THA

#### 3.4.1.1 La Pentamidine

La pentamidine (Pentacarinat®) est une molécule indiquée dans le traitement de la leishmaniose viscérale, mais cette molécule possède également une activité trypanocide importante. C'est d'ailleurs contre la maladie du sommeil qu'elle fût pour la première fois utilisée en 1940 sur la côte ouest africaine. Cette diamidine aromatique (Figure 7) est seulement efficace sur le stade 1 de la maladie à cause de son inaptitude à traverser la barrière hémato-encéphalique.<sup>129</sup> En effet, sa nature cationique l'empêche de traverser cette barrière et lui confère une forte affinité pour les protéines plasmatiques.<sup>130</sup> La pentamidine est active sur *T. b. gambiense* mais très peu efficace contre *T. b. rhodesiense*. Le traitement conseillé est une administration intra-musculaire quotidienne de 4 mg/kg/jour pendant 7 à 10 jours.<sup>131</sup>

L'un des plus gros avantages de cette molécule est que très peu de cas de résistances ont été recensés malgré une large utilisation depuis un siècle. Cependant les effets indésirables sont nombreux, incluant hypotension, hypoglycémie et néphrotoxicité.

Son mécanisme d'action trypanocide est analogue à celui évoqué pour son action antileishmanienne. La pentamidine a une forte affinité pour les acides nucléiques du kinétoplaste et va tuer les trypanosomes par destruction de cet ADN mitochondrial.<sup>132</sup> Son mécanisme principal implique surtout une accumulation à une concentration proche du millimolaire dans le trypanosome, qui va provoquer des dégâts variés et mener à la mort du parasite.<sup>133</sup> Les quelques cas de résistances à la pentamidine ont montré une diminution de son internalisation par le parasite due à des mutations au niveau de ses transporteurs.<sup>134</sup> Cependant, la rareté des cas recensés s'explique par le fait que la pentamidine traverse la membrane du parasite *via* différents types de transporteurs.<sup>135</sup> Ainsi, si une mutation a lieu sur l'un des transporteurs, elle sera compensée par un autre transporteur qui permettra tout de même le passage et l'action trypanocide sera préservée.

<sup>129</sup> N. Baker, H. P. De Koning, P. Mäser *et al.*, *Trends Parasitol.*, **2013**, 29, 110-118.

<sup>130</sup> M. P. Barrett, I. M. Vincent, R. J. Burchmore, *et al.*, *Future Microbiol.*, **2011**, 6, 1037-1047.

<sup>131</sup> P. Babokhov, A. O. Adekunle, W. A. Oyibo *et al.*, *Pathog. Glob. Health*, **2013**, 107, 242-252.

<sup>132</sup> T. A. Shapiro et P. T. Englund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 950-954.

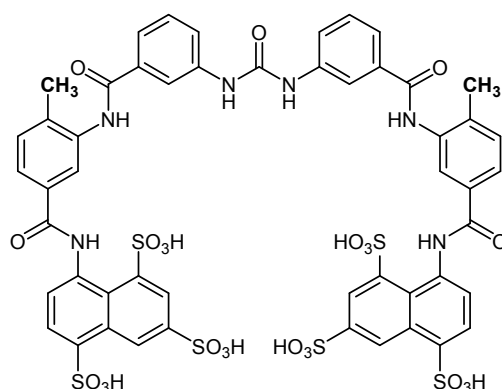
<sup>133</sup> D. Damper et C. L. Patton, *J. Protozool.*, **1976**, 23, 349-356.

<sup>134</sup> N. S. Carter, B. J. Berger et A. H. Fairlamb, *J. Biol. Chemistry*, **1995**, 270, 28153-28157.

<sup>135</sup> H. D. De Koning, *Int. J. Parasitol.*, **2001**, 31, 512-522.

### 3.4.1.2 La Suramine

La suramine est un dérivé de naphthalène polysulfonaté, synthétisé pour la première fois en 1917 par W. Roehl. Son équipe s'intéressait alors à des dérivés trypanocides et avait remarqué la très bonne activité du bleu de trypan, un dérivé diazoïque possédant lui aussi un noyau naphthalène portant plusieurs fonctions acide sulfonique. Tout d'abord appelé Germanin, ce composé est maintenant connu comme suramine ou Bayer 205. La suramine a été utilisée pour la première fois contre la maladie du sommeil en 1922.<sup>136</sup>



**Figure 20 :** Structure de la suramine.

Ce médicament est actif sur les deux sous espèces de *T. brucei* pathogènes pour l'Homme, cependant elle est utilisée principalement contre *T. b. rhodesiense* car des échecs de traitement ont été reportés dans les années 1950 contre *T. b. gambiense*.<sup>131</sup> En plus de sa grande efficacité contre *T. b. rhodesiense*, un autre avantage de la suramine est le très faible nombre de cas de résistances au traitement rapportés depuis le début de son utilisation. Cependant, en raison de ses 6 charges négatives à pH physiologique et de sa grande taille, la suramine est seulement active sur le stade 1 de la maladie car elle ne passe pas la BHE.<sup>137</sup> Elle possède également des effets indésirables comprenant nausées, anémie et néphrotoxicité. Le traitement recommandé est une administration par voie intraveineuse de 20 mg/kg, une fois par semaine pendant 4 semaines.

Le mécanisme d'action de la suramine n'est pas encore totalement élucidé. Cette structure chargée négativement se lierait à des protéines plasmatiques avec une grande affinité, comme les lipoprotéines à basse densité (LDL), qui permettent l'internalisation dans le parasite de ce complexe LDL-Suramine par endocytose.<sup>138</sup> Une fois dans le parasite, elle agirait de diverses façons sur le métabolisme :

- 1) Par inhibition des enzymes impliquées dans la glycolyse, la seule source d'énergie du parasite.

<sup>136</sup> T. E. Voogd, E. L. M. Vansterkenurg, J. Wilting *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, **1993**, 45, 177-203.

<sup>137</sup> F. Hawking, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1940**, 34, 37-52.

<sup>138</sup> A. J. Nok, *Parasitol. Res.*, **2003**, 90, 71-79.

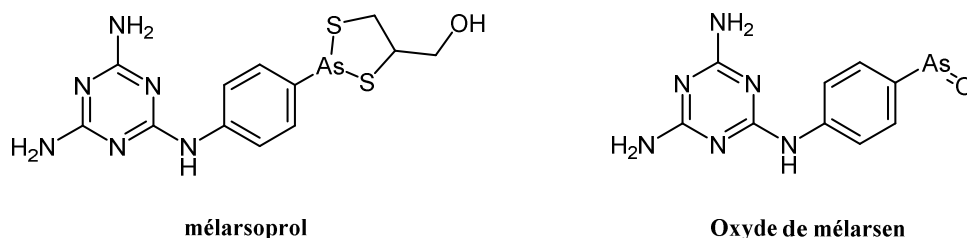
- 2) Par inhibition du transport de cholestérol indispensable à la croissance du parasite, *via* le complexe formé avec les lipoprotéines à basse densité (LDL).
- 3) Par accumulation dans le lysosome et inhibition de toutes les enzymes présentes comme les phosphatases acides ou les pyrophosphatases acides.
- 4) Par inhibition de nombreuses enzymes glycolytiques chargées positivement.

Les cas de résistances sont très rares, ainsi peu d'études ont été réalisées à ce sujet. Une hypothèse évoquée est que le trypanosome développerait un mécanisme d'exclusion de la molécule en dehors du parasite, empêchant son activité trypanocide.<sup>135</sup>

### 3.4.2 Les traitements du stade 2 de la THA

#### 3.4.2.1 Le Mélsarsoprol.

Le mélsarsoprol est un dérivé découvert par A. H. Friedheim, un pathologiste, microbiologiste et chimiste d'origine suisse. Cette molécule contient un atome d'arsenic trivalent, chélaté par un motif dimercaprol. Il est utilisé contre la maladie du sommeil depuis son introduction en 1949 et possède comme caractéristique d'être actif sur les deux sous-espèces pathogènes de *Trypanosoma brucei*. De plus, par des propriétés physico-chimiques favorables, ce composé traverse la BHE et est actif sur le stade 2 de la THA pour *T. b. gambiense* et pour *T. b. rhodesiense*. Il devient ainsi le médicament le plus utilisé jusqu'en 2009, année à partir de laquelle la combinaison Eflornithine/Nifurtimox (NECT) lui sera préférée.<sup>139</sup>



**Figure 21 :** Structure du mélsarsoprol et de son métabolite actif principal l'oxyde de mélsarsen.

Ce composé est par ailleurs le seul disponible à ce jour pour traiter le stade 2 de la THA provoquée par *T. b. rhodesiense*. Cependant, il possède de nombreux effets indésirables allant jusqu'à engager le pronostic vital des patients. Les premiers signes impliquent l'apparition de fièvre ou diarrhées tandis que 5 à 20% des patients vont présenter une encéphalopathie avec crises d'épilepsie et fortes fièvres, maux de tête et nausées. La moitié des patients qui vont contracter cette encéphalopathie vont tomber dans le coma puis mourir dans un délai de 48 heures, la cause n'étant toujours pas totalement déterminée.<sup>140</sup> Le traitement recommandé est une administration par voie intraveineuse d'une solution

<sup>139</sup> J. Pepin et F. Milord, *Adv. Parasitol.*, **1994**, 33, 1-47.

<sup>140</sup> M. Balasegaram, H. Young, F. Chappuis *et al.*, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2009**, 103, 280-290.

à 3,6% de mélarsoprol solubilisé dans une solution contenant du propylène glycol, pour une dose de 2,2 mg/kg/jour pendant 10 jours. Ce traitement a montré un taux de guérison des patients de 96% un an après le traitement et de 86,2% après deux ans.<sup>141</sup> Cependant l'apparition de résistances augmentant la fréquence des échecs thérapeutiques à 30%, son usage est de plus en plus restreint et limité à la prise en charge du stade 2 de la THA provoquée par *T. b. rhodesiense*.<sup>131</sup>

Son mécanisme d'action est encore très flou. Le mélarsoprol serait rapidement métabolisé en oxyde de mélarsen qui atteint sa concentration la plus élevée seulement 15 minutes après administration.<sup>142</sup> Son transport dans le trypanosome serait assuré par des transporteurs à purine (Transporteur P2) et par des protéines de transport membranaire (AQP2). Une fois dans le parasite, ce dérivé interagirait avec une forme de la trypanothione formant un complexe Me-T qui inhiberait compétitivement la trypanothione réductase, une enzyme impliquée dans le mécanisme de défense anti-oxydant.<sup>143</sup> Enfin autre hypothèse évoquée, le mélarsoprol inhiberait le métabolisme énergétique du trypanosome dont l'effet serait notamment une perte de sa mobilité.<sup>144</sup>

Ce traitement est par ailleurs le seul pour lequel une augmentation du nombre de résistances a été observé ces dernières années. Le mécanisme de ces résistances est encore à l'étude mais il impliquerait des mutations au niveau des mécanismes d'entrée dans le trypanosome, à savoir le transporteur P2 et la protéine membranaire AQP2.<sup>145</sup> Autre possibilité évoquée, la surexpression de transporteurs ABC qui augmenterait l'évacuation du médicament en dehors du trypanosome.<sup>146</sup>

Enfin, il existe des cas des résistances croisées entre le mélarsoprol et la pentamidine qui confirment l'implication des récepteurs P2 et AQP2, ces derniers, participant également à l'entrée de la pentamidine dans les parasites.

### 3.4.2.2 L'Eflornithine.

L'éflornithine, aussi appelée  $\alpha$ -difluorométhylornithine, est un dérivé racémique de l'ornithine qui a été utilisé dans les années 1970 en tant qu'anticancéreux. Ses propriétés trypanocides ont été observées pour la première fois par le biologiste Cyrus Bacchi en 1980 et l'éflornithine a finalement été utilisée contre *T. b. gambiense* à partir de 1990.<sup>147</sup> Ce médicament est actif sur les deux stades d'une infection due à *T. b. gambiense* mais ne l'est sur aucun des deux pour *T. b. rhodesiense*. En plus d'être plus efficace que le mélarsoprol contre le stade 2 de la THA par *T. b. gambiense*, un traitement par

<sup>141</sup> C. Schmid, M. Richer, C. M. Bilenge *et al.*, *J. Infect. Dis.*, **2005**, 191, 1922-1931.

<sup>142</sup> J. Keiser, O. Ericsson et C. Burri, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2000**, 67, 478-488.

<sup>143</sup> M. L. Cunningham, M. J. Zvelebil et A. H. Fairlamb, *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 221, 285-295.

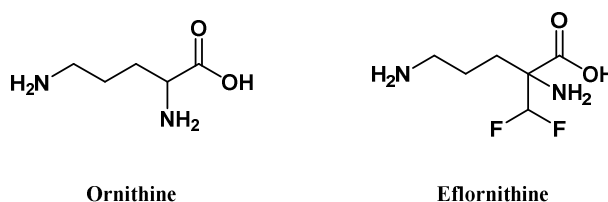
<sup>144</sup> A. H. Fairlamb et D. Horn, *Trends Parasitol.*, **2018**, 34, 481-492.

<sup>145</sup> N.S Carter et A. H. Fairlamb, *Nature*, **1993**, 361, 173-176.

<sup>146</sup> M. R. Perry, S. Wyllie, A. Raab *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, 110, 19932-19937.

<sup>147</sup> D. Steverding, *Parasit. Vectors*, **2010**, 3:15.

l'éflornithine provoque un taux de décès de 1,4% alors que celui par le dérivé d'arsenic est de 5%.<sup>148</sup> Cependant, l'éflornithine entraîne également quelques effets indésirables comprenant diarrhées, crises d'épilepsie, maux de tête, anémie ou leucopénie. Le principal inconvénient réside surtout dans la voie d'administration du traitement : perfusion intraveineuse de 100 mg/kg qui dure 6 h pendant 14 jours. De plus, il est très cher (prix estimé à 554€ par traitement) donc non disponible pour les populations à faible revenus.<sup>149</sup>



**Figure 22 :** Structure de l'ornithine et de son analogue éflornithine.

Son mécanisme d'action passe par l'inhibition irréversible de l'ornithine décarboxylase qui va provoquer la diminution de la concentration en polyamines dans les parasites, composés essentiels à sa prolifération et à sa capacité à se diviser par scissiparité.<sup>150</sup> Les trypanosomes vont se transformer en une forme courte qui sera éliminée par le système immunitaire de l'hôte. Un autre effet est la surexpression de la méthionine *S*-adénosyle dans le trypanosome qui va déréguler la méthylation de protéines et d'acides nucléiques.<sup>151</sup>

Ce sont d'ailleurs ces ornithine décarboxylases qui expliquent la sélectivité d'action sur *T. b. gambiense*. Ces enzymes possèdent un « turnover rate » de 4,3 heures chez *T. b. rhodesiense* tandis qu'il est beaucoup plus marqué chez *T. b. gambiense*, de l'ordre de 18-19 heures.<sup>130</sup> L'effet de l'éflornithine sera donc beaucoup plus long chez *T. b. gambiense*, l'enzyme mettant beaucoup plus de temps à se régénérer après inhibition. Aujourd'hui, il n'y a pas de résistance rencontrée sur le terrain, même si certaines souches résistantes ont été obtenues en laboratoire.<sup>152</sup>

<sup>148</sup> G. Priotto, L. Pinoges, I. B. Fursa, *et al.*, *BMJ.*, **2008**, 336, 705-708.

<sup>149</sup> P. P. Simarro, J. Franco, A. Diarra *et al.*, *Parasitology*, **2012**, 139, 842-846.

<sup>150</sup> C. J. Bacchi, J. Garofalo, D. Mockenhaupt *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1983**, 7, 209-225.

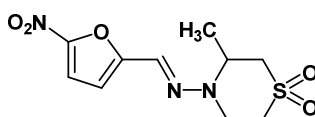
<sup>151</sup> N. Yarlett et C. J. Bacchi, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1988**, 27, 1-10.

<sup>152</sup> I. M. Vincent, D. Creek, D. G. Watson *et al.* *PLoS Pathog.*, **2010**, 6, e1001204.

### 3.4.2.3 Le Nifurtimox

Le nifurtimox est un 5-nitrofurane développé en 1960 par Bayer et utilisé pour la première fois en 1967 contre la maladie de Chagas.<sup>151</sup> Dans les années 1970, des essais cliniques ont été réalisés pour évaluer son efficacité sur la trypanosomiase humaine africaine.

Bien que les résultats obtenus varient selon les essais cliniques réalisés, ils ont montré que ce composé est actif sur les deux stades d'une THA par *T. b. gambiense*, tandis qu'il l'est beaucoup moins pour une THA par *T. b. rhodesiense*.<sup>153,154</sup> Il a par la suite été autorisé seulement pour traiter les patients infectés par *T. b. gambiense* résistants au mélarsoprol, avec une efficacité variant de 30% et 80% pour des doses de 15 mg/kg/jour pendant 60 jours ou 30 mg/kg/jour pendant 30 jours.<sup>155</sup>



**Figure 23 :** Structure du nifurtimox

L'avantage majeur de cette molécule est son administration possible per os dans le traitement de la THA. Cependant, de nombreux effets indésirables ont été observés incluant des troubles gastrointestinaux (nausées, anorexie, perte de poids) et des troubles neuropsychiatriques. De plus, de nombreux cas de rechutes après traitement ont été observés et il est maintenant utilisé principalement en combinaison avec l'éflornithine (NECT).<sup>156</sup> Enfin, le nifurtimox est un composé dont la génotoxicité a été démontrée *in vitro* avec des dégâts sur l'ADN de cellules humaines même à faibles concentrations.<sup>157</sup>

Son mécanisme d'action passerait par sa bioactivation *via* une nitroréductase parasitaire (NTR) qui va catalyser la réduction à deux électrons du groupement nitro en nitroso. Une deuxième réduction à deux électrons, catalysée par la NTR, va permettre la formation d'un intermédiaire hydroxylamine puis à une chaîne nitrile insaturée, toxique pour le trypanosome, via l'ouverture du furane (figure 24).<sup>158</sup> Cet intermédiaire réagirait alors avec des protéines contenant des groupements soufrés comme la cystéine et les inhiberait par liaison covalente, menant à la mort du parasite.<sup>159</sup>

<sup>153</sup> P. G. Janssens et A. Demuyne, *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **1977**, 57, 475-480.

<sup>154</sup> M. Kaiser, M. A. Bray, M. Cal *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, 55, 5602-5608.

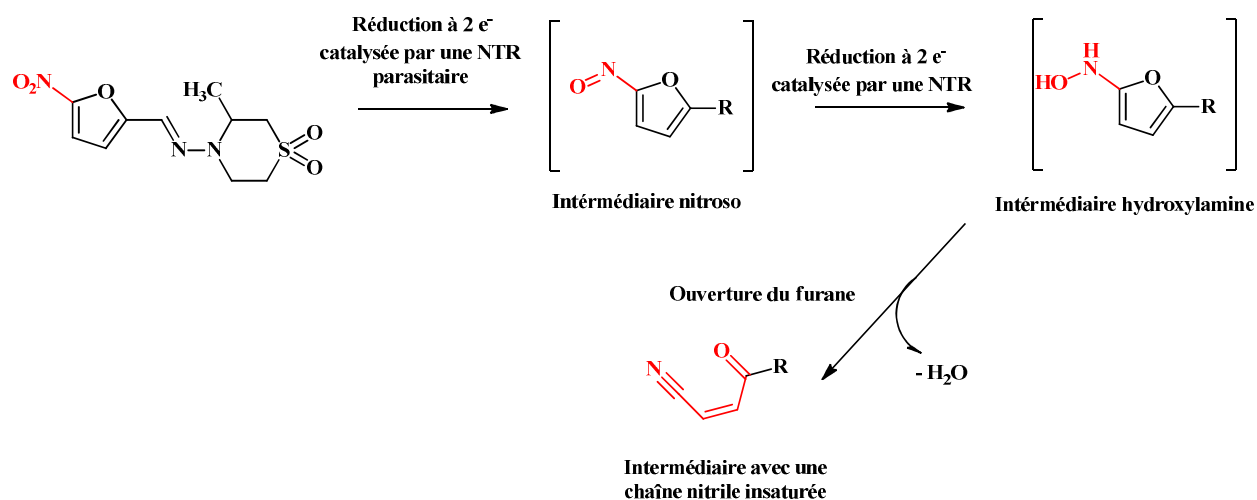
<sup>155</sup> J. Pépin, F. Milord, F. Meurice *et al.*, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1992**, 86, 254-256.

<sup>156</sup> G. Eperon, M. Balasegaram, J. Potet *et al.*, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, **2014**, 12, 1407-1417.

<sup>157</sup> A. Buschini, L. Ferrarini, S. Franzoni *et al.*, *J. Parasitol. Res.*, **2009**, 2009, DOI: 10.1155/2009/463757.

<sup>158</sup> B. S. Hall, C. Bot et S. R. Wilkinson, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 13088-13095.

<sup>159</sup> S. Patterson et S. Wyllie, *Trends Parasitol.*, **2014**, 30, 289-298.



**Figure 24 :** Mécanisme de bioactivation du nifurtimox par une nitroreductase parasite menant à un intermédiaire toxique pour le trypanosome.

Des études sont déjà réalisées en laboratoire sur les possibles résistances à ce composé nitroaromatique. Ainsi après avoir obtenus des souches de *T. brucei* résistantes, des études génomiques ont été réalisées. Sur les 8 gènes associés à la résistance au nifurtimox, 6 d'entre eux sont en lien avec le phénomène de bioactivation de cette molécule *via* la nitroréductase parasite, confirmant l'hypothèse mécanistique et lien entre l'activité trypanocide et cette enzyme.



### 3.4.3 Bilan

Médicament	Mécanisme d'action	Voie d'administration	Avantages	Limites
Pentamidine	Cible l'ADN parasite, s'accumule dans le trypanosome	IM	Traitement court	Seulement actif sur le stade 1 de <i>t. b. gambiense</i> , toxique
Suramine	Inhibe les enzymes impliqués dans la glycolyse, et les transporteurs de cholestérol.	IV	Le seul à traiter le stade 1 de <i>t. b. rhodesiense</i> .	Ne passe pas la BHE, toxique
Mélarsozol	Inhibe la trypanothione réductase et agit sur le métabolisme énergétique (glycolyse)	IV	Actif sur les deux sous-espèces, le seul pour traiter le stade 2 de <i>T. b. rhodesiense</i> .	Très toxique (5% décès) et augmentation du nombre d'échec thérapeutique.
Eflornithine	Inhibe l'ornithine décarboxylase et perturbe les réactions de méthylation des macromolécules.	Lente perfusion par voie IV	Actif sur le stade 2 de <i>T. b. gambiense</i> , moins toxique que le Mélarsozol.	Toxique, très cher et l'administration est longue et complexe
Nifurtimox	Inhibe des biomolécules contenant un soufre après bioactivation par une nitroréductase	Orale	Voie d'administration orale, actif sur le stade 2 de <i>T. b. gambiense</i> .	Toxique, une efficacité variable, pas actif sur <i>T. b. rhodesiense</i> .

**Tableau 6 :** Principales caractéristiques des traitements disponibles pour la THA.

Comme nous pouvons le voir dans le tableau ci-dessus, il existe très peu de médicaments pour soigner la trypanosomiase humaine africaine. De plus ceux-ci sont très souvent dépendants de la sous-espèce (*T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense*) et du stade de la maladie (stade hémato-lymphatique ou stade méningo-encéphalique). Par exemple, le mélarsoprol est la seule molécule à être efficace contre le stade 2 de *T. b. rhodesiense*.

Après des tests d'associations lors d'essais cliniques incluant le mélarsoprol-nifurtimox, le mélarsoprol-éflornithine et l'éflornithine-nifurtimox, il s'est avéré que cette dernière était de loin la meilleure.<sup>160</sup> Elle est plus efficace (95 à 98% de taux de guérison) que la monothérapie à l'éflornithine avec des effets indésirables moins marqués, un traitement plus court et un coût moins élevé.<sup>161</sup> Cette combinaison est appelée NECT (Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy), elle est devenue le traitement standard pour soigner le stade 2 de la THA (95% des cas de *T. b. gambiense* en 2013) et a été ajouté à la liste des médicaments essentiels de l'OMS en 2009.<sup>102</sup>

### 3.5 Les traitements contre la Maladie de Chagas.

#### 3.5.1 Le Nifurtimox

Le nifurtimox (Lampit®, Bayer) a été la première molécule utilisée dans le traitement de la maladie de Chagas en 1967. Il est également administré par voie orale chez les patients à une dose de 8-10 mg/kg/jour pendant 60 à 90 jours. Si pour la phase aiguë, le taux de guérison est compris entre 80% et 90% chez l'enfant ou chez l'adulte, pour la phase chronique, le traitement au nifurtimox donne des résultats très différents avec un taux de guérison de 86% chez l'enfant et de 8% chez l'adulte.<sup>162</sup>

Par ailleurs, le traitement de la maladie de Chagas par le nifurtimox provoque les mêmes effets indésirables que pour le traitement de la trypanosomiase humaine africaine et n'est plus prescrit dans de nombreux pays comme le Brésil ou le Chili pour ces raisons. Le nifurtimox est également bioactivé par une nitroréductase de *T. cruzi* menant à la mort du parasite *via* le même mécanisme d'action.<sup>163</sup> Enfin, à cause de traitements souvent très longs, 20 à 25% des cas sont désormais résistants à ce traitement. Le mécanisme de résistance impliqué serait le même que pour la THA, à savoir des mutations au niveau de la nitroréductase qui ne serait plus capable de bioactiver ce composé nitroaromatique.<sup>164</sup>

<sup>160</sup> G. Priotto, C. Fogg, M. Balasegaram, *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, *1*, e39.

<sup>161</sup> C. Schmid, A. Kuemmerle, J. Blum, *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2012**, *6*, e1920.

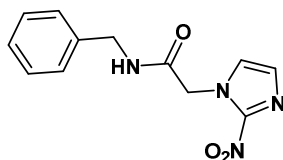
<sup>162</sup> J. C. Rodriques et S. L. De Castro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **2002**, *97*, 3-24.

<sup>163</sup> S. H. Wilkinson, M. C. Taylor, D. Horn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 5022-5027

<sup>164</sup> S. M. Murta, R. T. Gazzinelli, Z. Brener *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1998**, *93*, 203-214.

### 3.5.2 Le Benznidazole

Le benznidazole (Rochagan®, LAFEPE) est un dérivé de 2-nitroimidazole couplé à une benzylamine commercialisé en 1971 par le laboratoire Roche contre la maladie de Chagas, à la suite de travaux de E. Grunberg.<sup>165</sup> Les droits de ce médicament ont ensuite été transférés en 2011 à un laboratoire public brésilien (Laboratorio Farmaceutico do Estado de Pernambuco) puis en 2012 une version générique a vu le jour en Argentine sous le nom d'Abarax.<sup>166</sup> Ce nitroimidazole est aujourd'hui préféré au nifurtimox dans le traitement de la maladie de Chagas en raison d'une meilleure efficacité et des effets indésirables moins importants. Ce médicament est administrable par voie orale et le traitement recommandé est de 5-7,5 mg/kg/jour pendant 60 jours.<sup>120</sup> Son efficacité varie grandement entre les différents stades de la maladie. Si le taux de guérison est de 76 % pour la phase aiguë chez l'enfant et l'adulte, le taux de guérison pour la phase chronique descend jusqu'à 60% chez l'enfant et jusqu'à 2 à 40% chez l'adulte.<sup>167</sup> Comme le nifurtimox, son principal avantage est d'être administrable par voie orale ce qui supprime tous les frais d'hospitalisation nécessaires pour les autres voies. Cependant des effets indésirables sont tout de même présents incluant démangeaisons, problèmes gastrointestinaux, maux de tête et troubles du sommeil. Ses propriétés génotoxiques ont comme pour le nifurtimox été démontrées *in vitro* avec des dégâts au niveau de l'ADN de cellules humaines même à faibles concentrations.<sup>157</sup>



**Figure 25 :** Structure du benznidazole

Son mécanisme d'action implique comme le nifurtimox une nitroréductase parasitaire (NTR) qui à la suite de deux réductions successives va le transformer en un intermédiaire hydroxylamine. A la suite de nouvelles réactions non-enzymatiques, le glyoxal sera généré (figure 26). Ce double aldéhyde est très électrophile et sera capable d'interagir avec les macromolécules présentes chez le trypanosome et provoquer sa mort.<sup>168</sup> Des résistances ont été rapportées et leur mécanisme est le même que pour le nifurtimox à savoir des mutations de la nitroréductase qui ne sera plus capable de bioactiver ces composés nitroaromatiques. Plus inquiétant, les parasites résistants au nifurtimox sont également résistants au benznidazole dans de nombreux cas, ce qui signifie qu'il n'y a actuellement aucun

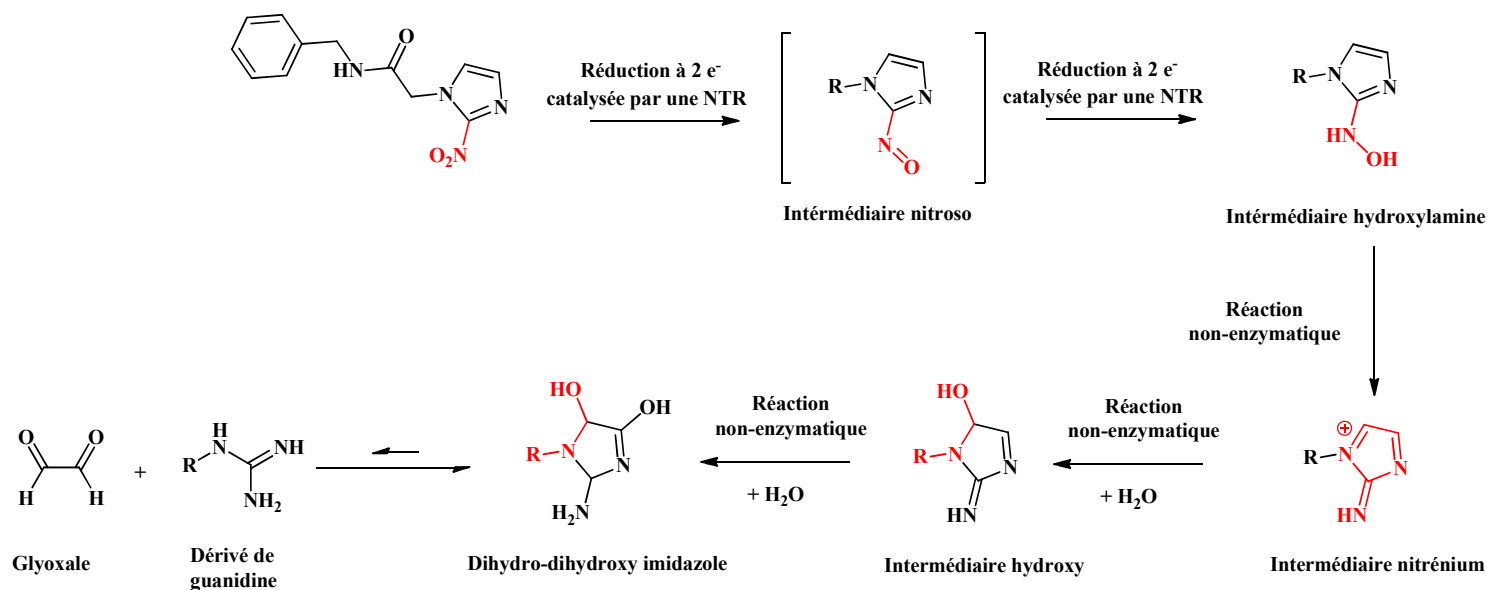
<sup>165</sup> E. Grunberg, G. Beskid, R. Cleeland *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1967**, 7, 513-519.

<sup>166</sup> J. D. Alpern, R. Lopez-Velez et W. M. Stauffer, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2017**, 11, e0005794.

<sup>167</sup> J. R. Cancado, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1999**, 94, 331-335.

<sup>168</sup> P. J. Thornallay, *Drug Metabol. Drug Interact.*, **2008**, 23, 125-150.

médicament sur le marché pour traiter les patients qui sont infectés par des parasites résistants à ces deux traitements, au mécanisme d'action similaire.<sup>169</sup>



**Figure 26 :** Mécanisme de bioactivation du benznidazole par une nitroréductase parasitaire, menant à la formation de glyoxale, toxique pour le parasite.

Que cela soit pour la leishmaniose viscérale ou pour les trypanosomiasés, il est important de trouver de nouvelles molécules. Les traitements actuellement sur le marché sont peu nombreux (5 pour la LV, 5 pour la THA et 2 pour la maladie de Chagas) et présentent de très nombreux effets indésirables graves et des coûts souvent élevés. De plus, bien que peu nombreuses à l'heure actuelle sur le terrain, les souches résistantes à la suramine et au nifurtimox créés en laboratoire appellent à la vigilance. Vis-à-vis des populations touchées par ces deux maladies, le développement de médicaments administrables par voie orale, avec un très bon index de sélectivité limitant les effets indésirables et disponibles économiquement pour les pays les plus pauvres, est plus que jamais urgent.

Aujourd'hui, très peu de molécules sont présentes en essais cliniques contre la leishmaniose viscérale, la trypanosomiase humaine africaine et la maladie de Chagas. Parmi elles, un nouveau dérivé nitré en série 5-nitroimidazole et un benzoxaborole, tous deux développés par la Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) semblent les plus prometteurs.

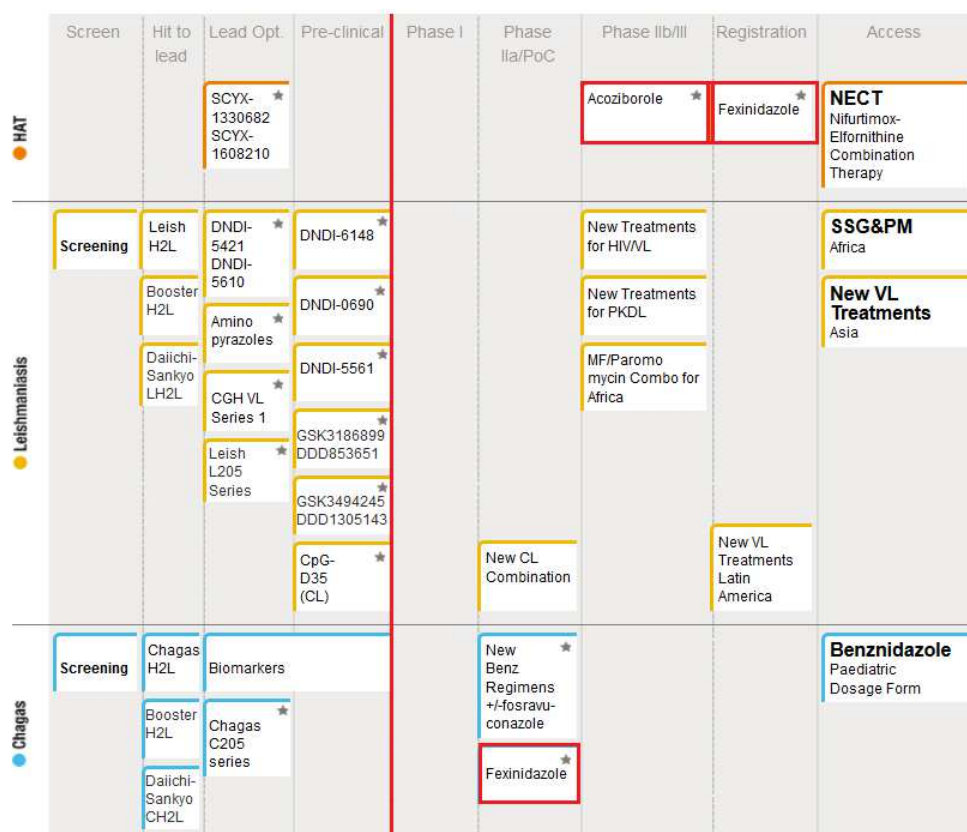
<sup>169</sup> M. C. O. Campos, L. L. Leon, M. C. Taylor *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2014**, 193, 17-19.

## CHAPITRE 2

**Molécules antikinétoplastidés  
en développement et  
bioactivation de composés  
nitroaromatiques par les  
nitroréductases parasitaires.**

## Chapitre 2 : Molécules antikinétoplastidés en développement et bioactivation de composés nitroaromatiques par les nitroréductases parasitaires.

Aujourd'hui, peu de molécules sont disponibles sur le marché pour le traitement de la leishmaniose viscérale (LV), de la trypanosomiase humaine africaine (THA) et de la maladie de Chagas (MC). De par leur faible tolérance par les patients et l'apparition de résistances aux dérivés antimoniés et à la miltéfosine, il y a une urgence dans le développement de nouvelles molécules aux mécanismes d'action novateurs. Malgré cela, d'après le « Drugs for Neglected Diseases initiative », le principal consortium qui développe de nouveaux traitements antiparasitaires, seules deux nouvelles molécules sont actuellement en essais cliniques. La Figure 27 représente ainsi les différents projets en essais pré-cliniques et en essais cliniques contre la THA, la LV et la MC, développés aujourd'hui par cet organisme.<sup>170</sup>



**Figure 27 :** Portfolio des molécules en essais cliniques et pré-cliniques contre la LV, la THA et la MC, les nouvelles entités chimiques étant encadrées en rouge.<sup>162</sup>

Parmi ces projets, deux grandes catégories peuvent être distinguées : l'association ou la formulation de molécules déjà sur le marché et des nouvelles entités chimiques aux nouveaux mécanismes d'action qui représentent l'innovation. Au total, 9 projets sont développés en essais cliniques contre la THA, la LV et la MC:

<sup>170</sup> DNDi, <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/>, consulté les 04/07/2018, mis à jour 06/2018.



- 1) Contre la THA, les deux projets correspondent à deux nouvelles entités chimiques. L'acoziborole, un dérivé de benzoxaborole, et le fexinidazole, un 5-nitroimidazole, sont respectivement en essais cliniques de phase IIb et IIIb (2 nouvelles molécules sur 2 projets).
- 2) Contre la LV, si différents projets sont en cours au stade pré-clinique, il n'y a actuellement aucune nouvelle entité chimique en essais cliniques. En effet, seules des associations de médicaments déjà sur le marché sont développées avec une association amphotéricine B/miltéfosine pour des co-infections VIH/VL ou une association paromomycine/miltéfosine en Asie, en Afrique ou en Amérique du Sud notamment. (0 nouvelle molécule sur 5 projets)
- 3) Pour la MC, il n'y a que deux projets qui sont en essais cliniques. Le fexinidazole qui est également développée contre la THA et une association de benznidazole - fosravuconazole. Ce dernier est un dérivé d'azole antifongique utilisé contre les mycoses unguéales qui a montré une bonne activité anti-*Trypanosoma cruzi* mais une perte d'efficacité moyenne à long terme. (1 nouvelle molécule sur 2 projets).

Ainsi, lorsque l'on regarde le portfolio de la DNDi contre ces 3 maladies, il y a actuellement 9 projets en essais cliniques. Parmi ces 9 projets, seules 2 nouvelles entités chimiques sont présentes avec l'acoziborole contre la THA et le fexinidazole contre la THA et la MD soit 33% des projets. Il y a donc très peu de nouvelles molécules antikinétoplastidés qui sont développées à ce jour, et l'urgence de découvrir de nouveaux composés sera d'autant plus grande en cas d'échecs des projets en cours lors des essais cliniques.

## **1. Les molécules en développement.**

### **1.1. Les nouvelles molécules en essais cliniques**

#### **1.1.1. Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la THA.**

##### **1.1.1.1. Les benzoxaboroles.**

Les médicaments contenant un atome de bore existent depuis les années 1970 avec le développement des acides arylboroniques, connus pour inhiber des protéases à sérine.<sup>171</sup> En effet, cet atome de bore possède des propriétés électroniques particulières avec une orbitale p vacante qui lui permet de réagir avec les sérines présentes dans les sites actifs de ces enzymes.<sup>172</sup> Ces composés borés ciblent différentes enzymes comme des  $\beta$ -lactamases ou diverses protéases, le bortézomib (Velcade®) étant même actuellement sur le marché pour traiter certains types de lymphomes.

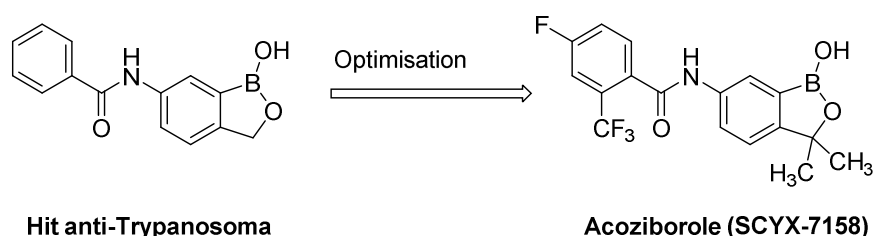
En 2002, Anacor Pharmaceuticals est créée. Cette entreprise pharmaceutique est spécialisée dans la synthèse et le développement de molécules avec un atome de bore contenu dans un cycle fusionné

<sup>171</sup> M. Philipp et M. L. Bender, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1971**, 68, 478-480.

<sup>172</sup> R. T. Jacobs, J. J. Plattner, B. Nare *et al.*, *Future Med. Chem.*, **2011**, 3, 1259-1278.



avec un second cycle aromatique, à l'image des benzoxaboroles. Ces benzoxaboroles sont déjà connus pour avoir des applications variées avec des propriétés antivirales,<sup>173</sup> antifongiques,<sup>174</sup> antibactériennes<sup>175</sup> ou encore antiparasitaires.<sup>176</sup> Ainsi, une série de 6-carboxamide-benzoxaborole anti-*Trypanosoma* a été découverte au cours d'un criblage de librairie de composés borés d'Anacor Pharmaceuticals.<sup>172</sup>



**Figure 28 :** Structure d'un hit anti-*Trypanosoma* et de son dérivé optimisé acoziborole.

Des travaux de pharmacomodulation antitrypanosomale ont alors été initiés comme présentés dans la figure 28. Ils ont étudié la substitution de la position 6 de ce noyau ainsi que la nature du lien entre le bihétérocycle contenant le bore et un groupement aryle. Dans un second temps, de très nombreux composés ont été synthétisés *via* l'introduction de substituants sur le groupement aryle ainsi que sur la partie hétérocyclique puis ont été testés.<sup>172</sup> Le SCYX-7158 a ainsi été choisi comme la molécule la plus prometteuse en vue de devenir un médicament contre la THA.

Cette molécule a été par la suite appelée acoziborole. Elle possède de très bonnes activités antitrypanosomales pour les deux stades de la THA à la fois sur *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*. L'acoziborole possède des caractéristiques physicochimiques et propriétés ADME *in vitro* intéressantes. De plus, elle a montré des premiers résultats *in vivo* très encourageants sur des modèles de souris infectées par *T. brucei*, témoignant d'un passage de la BHE.<sup>177</sup> En 2009, *via* une collaboration entre Anacor Pharmaceuticals et la DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*), l'acoziborole entre en essais pré-cliniques qui vont s'avérer concluants, tout comme les essais cliniques de phase I réalisés entre 2012 et 2015 contre la trypanosomiase humaine africaine à *T. b. gambiense*. La dose testée est une seule administration par voie orale de 960 mg d'acoziborole soit trois comprimés de 320 mg.<sup>178</sup> Aujourd'hui, ce composé est en essais cliniques de phase IIb/III contre le stade 2 d'une THA à *T. b. gambiense* et l'objectif est d'achever ces essais d'ici 2020.<sup>179</sup>

<sup>173</sup> A. Mahalingam, A. R. Geonnotti, J. Balzarini *et al.*, *Mol. Pharm.*, **2011**, 8, 2465-2475.

<sup>174</sup> A. Markham, *Drugs*, **2014**, 74, 1555-1558.

<sup>175</sup> E. J. Goldstein, D. M. Citron, K. L. Tyrrell *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 4872-4876.

<sup>176</sup> Y. K. Zhang, J. J. Plattner, E. E. Easom, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 5589-5593.

<sup>172</sup> R. T. Jacobs, J. J. Plattner, B. Nare *et al.*, *Future Med. Chem.*, **2011**, 3, 1259-1278.

<sup>177</sup> R. T. Jacobs, B. Nare, S. A. Wring *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2011**, 5, e1151.

<sup>178</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01533961>, mis à jour en 09/2015, consulté en 06/2018

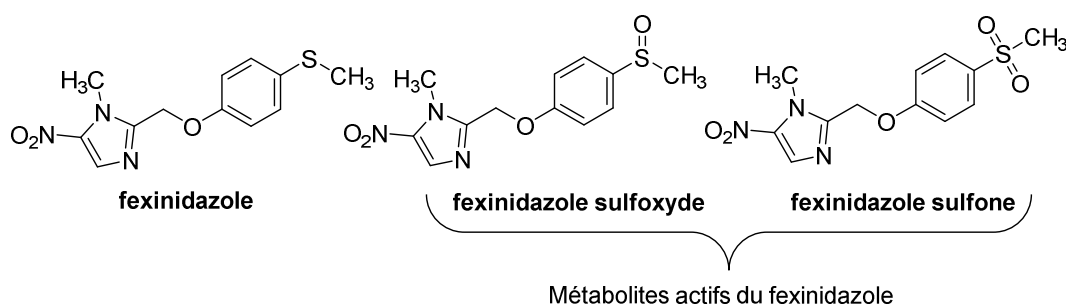
<sup>179</sup> DNDi, <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/scyx-7158/>, consulté en 06/2018

Le mécanisme d'action antitrypanosomal de ce benzoxaborole est encore inconnu. Cependant, de récentes études métabolomiques ont indiqué qu'il pourrait agir sur le métabolisme de la méthionine et plus particulièrement *via* l'inhibition de méthyltransférases.<sup>171</sup> Ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques comme la synthèse protéique, la régulation du cycle cellulaire ou de l'expression génique. Une autre étude portant sur des souches de *T. brucei* rendues résistantes à l'acoziborole suggère que le mécanisme d'action serait polypharmacologique, plusieurs cibles menant à l'action trypanocide de cette molécule.<sup>180</sup> L'avantage principal d'un mécanisme polypharmacologique est qu'il réduit les chances de développement de résistances.

#### 1.1.1.2. Le fexinidazole.

Les 5-nitroimidazoles sont des composés connus pour avoir des propriétés antiparasitaires depuis les années 1950, avec un premier brevet déposé par Rhône-Poulenc (aujourd'hui Sanofi) pour des propriétés anti-*trichomonas*, un parasite de l'être humain qui se transmet par voie sexuelle.<sup>181</sup> En 1966, les premiers articles décrivant la synthèse de ces 5-nitroimidazoles pour des applications antiparasitaires sont ainsi publiés, montrant un intérêt croissant pour ces dérivés nitroaromatiques. En 1978, un dérivé du 5-nitroimidazole est décrit pour avoir des propriétés trypanocides par Hoechst (aujourd'hui Sanofi).<sup>182</sup> Des études *in vivo* ultérieures montreront que ce dérivé est efficace sur des modèles de souris en THA de stade II mais son développement sera tout de même arrêté à cause de la mauvaise réputation des composés nitroaromatiques sur le plan toxicologique.<sup>183</sup>

Lors d'un criblage réalisé sur *T. brucei* par la DNDi de plus de 700 composés nitrohétérocycliques, le fexinidazole a été redécouvert.<sup>184</sup>



**Figure 29 :** Structure du fexinidazole et de ses deux métabolites actifs.

Des études pré-cliniques ont alors été réalisées montrant que l'administration par voie orale du fexinidazole était efficace sur des modèles murins de THA de stade 1 et de stade 2.<sup>185</sup> Ce 5-

<sup>171</sup> M. Philipp et M. L. Bender, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1971**, 68, 478-480.

<sup>180</sup> D. C. Jones, B. J. Foth, M. D. Urbaniak *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2015**, 9, e0004299.

<sup>181</sup> R. M. Jacob, G. L. Régner et C. Crisan, *Chem. Abstr.*, **1961**, 55, 1657.

<sup>182</sup> E. Winkelmann, W. Raether et A. Sinharay, *Arzneimittel-Forschung*, **1978**, 28, 739-749

<sup>183</sup> F. W. Jennings et G. M. Urquhart, *Z. Parasitenkd.*, **1983**, 69, 577-581.

<sup>184</sup> E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2010**, 4, e923.

<sup>185</sup> M. Kaiser, M. A. Bray, M. Cal *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, 55, 5602-5608.

nitroimidazole est alors entré en essais cliniques de phase I en 2009, les résultats ont été concluants pour l'administration d'une seule dose allant de 100 à 3600 mg.<sup>186</sup> En effet il a été bien toléré par les patients avec une bonne absorption de la molécule *via* une administration par voie orale pendant les repas. Cette étude a également permis l'identification de deux métabolites actifs du fexinidazole, qui sont présentés dans la figure 29. Une fois absorbé par le patient, le fexinidazole est métabolisé très rapidement par des cytochromes P450 et une flavine mono-oxygénase (FMO-3) en fexinidazole sulfoxyde, qui atteint sa concentration plasmatique maximale 2 à 5 h après l'administration. Ce composé est lui-même métabolisé en fexinidazole sulfone, cette oxydation est plus lente, ce métabolite atteignant une concentration plasmatique maximale environ 24 h après l'administration. En 2012, des essais cliniques de phase IIb/III ont été initiés pour comparer son efficacité à celle de la combinaison Nifurtimox/Eflornithine (NECT) avec une dose journalière de 1800 mg pendant 4 jours puis 1200 mg pendant 6 jours.<sup>187</sup> En plus d'une efficacité similaire (91% contre 98% pour la combinaison), sa facilité à être administrée sans nécessité d'hospitalisation des patients est un avantage majeur.

Aujourd'hui, des essais cliniques de phase IIIb sont en cours, avec pour objectif que le fexinidazole soit reconnu comme le premier traitement administrable par voie orale pour les deux stades de la THA (*T. b. gambiense*).<sup>188</sup> Le mécanisme d'action antiparasitaire du fexinidazole et de ses métabolites actifs impliquerait une nitroréductase parasitaire (NTR) de *T. brucei*. Même si l'identification de ces possibles métabolites et de leurs effets sur le parasite n'ont pas été décrits à ce jour, il existe des preuves indirectes. En effet, les souches de *T. brucei* résistantes au nifurtimox, un nitrohétérocycle bioactivé par la NTR du parasite, sont également résistantes au fexinidazole.<sup>189</sup>

### **1.1.2. Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la LV.**

#### **1.1.2.1. Les 8-aminoquinoléines.**

L'activité antileishmanienne des 8-aminoquinoléines n'est pas nouvelle bien que ces molécules soient surtout connues pour leurs activités antipaludiques avec la primaquine comme chef de file. L'observation de l'activité leishmanicide de cette dernière avait ainsi déjà été observée en 1951 sur des modèles animaux, ce qui a initié des travaux de pharmacomodulation avec pour but d'identifier de nouveaux analogues à l'activité améliorée.<sup>190</sup>

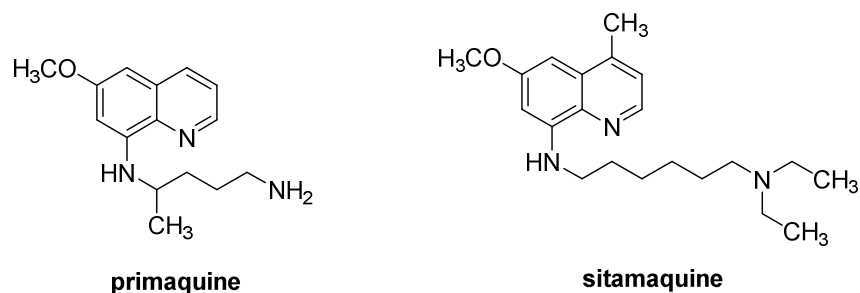
<sup>186</sup> A. Tarral, S. Blesson, O. V. Mordt *et al.*, *Clin. Pharmacokinet*, **2014**, 53, 565-580.

<sup>187</sup> V. K. B. K. Mesu, W. M. Kalonji, C. Bardonneau *et al.*, *Lancet*, **2018**, 391, 144-154.

<sup>188</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03025789?term=fexinidazole&rank=3>, consulté en 06/2018

<sup>189</sup> A. Y. Sokolova, S. Wyllie, S. Patterson *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, 54, 2893-2900.

<sup>190</sup> C. Yeates, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2002**, 3, 1446-1452.



**Figure 30** : Structures de la primaquine et de la sitamaquine.

Ainsi, en 1956, des séries de 6-méthoxy-8-alkylaminoquinoléines ont été évaluées sur des modèles de hamster infectés par *L. donovani*. Ces dérivés ont montré de meilleures activités que les dérivés d'antimoine pentavalents, les médicaments de référence dans le traitement de la leishmaniose viscérale à cette époque.<sup>191</sup> En 1970, des études supplémentaires ont été réalisées indiquant que l'introduction d'un méthyle en position 4 de la primaquine mène à une activité antileishmanienne 15 fois meilleure que cette dernière et 30 fois meilleure que celle des dérivés d'Antimoine.<sup>192</sup> Finalement, suite à l'étude de la variation de la chaîne aminoalkyle en position 8 de la primaquine, WR-6026 a été découvert par le Walter Reed Army Institute, elle est représentée dans la Figure 30. Maintenant appelée sitamaquine, cette molécule présente une activité antileishmanienne 708 fois plus importante que celle de l'antimoniate de méglumine.<sup>192</sup> Elle a été développée en collaboration avec GlaxoSmithKline.

La sitamaquine possède comme avantage majeur d'être administrable par voie orale. Des essais cliniques de phase II ont été réalisés au Kenya en 1994,<sup>193</sup> au Brésil en 2001<sup>194</sup> puis en Inde et au Kenya une seconde fois en 2005.<sup>195</sup> Les premiers résultats indiquent que la sitamaquine est bien tolérée pour des doses comprises entre 1,5 et 3 mg/kg/jour mais aussi que les taux de guérison varient grandement. En effet s'ils sont supérieurs à 80% au Kenya, ils sont de 67% et 20% seulement au Brésil pour des doses respectives de 2,5 et 3,25 mg/kg/jour. Les derniers résultats d'essais cliniques de la sitamaquine sont parus en 2011.<sup>196</sup> Ils ont été réalisés en Inde où le taux de guérison après 128 jours est de 85% pour une dose journalière de 2 mg/kg. Lors de ces études, quelques effets indésirables ont été remarqués incluant principalement néphrotoxicité et méthémoglobinémie.

Son mécanisme d'action n'est pas élucidé. Selon certaines études, la sitamaquine qui est une base faible cationique à pH physiologique, va interagir avec les phospholipides de la membrane parasitaire qui possèdent des groupements anioniques et pénétrer dans la leishmanie.<sup>197</sup> Dans le cytosol, cette

<sup>191</sup> E. Beveridge, L. G. Goodwin et L. P. Walls, *Nature*, **1958**, 182, 316-317.

<sup>192</sup> K. E. Kinnamon, E. A. Steck, P. S. Loizeaux *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1978**, 27, 751-757.

<sup>194</sup> K. E. Kinnamon, E. A. Steck, P. S. Loizeaux *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1978**, 27, 751-757.

<sup>193</sup> J. A. Sherwood, G. S. Gachihi, R. K. Muigai *et al.*, *Clin. Infect. Dis.*, **1994**, 19, 1034-1039.

<sup>194</sup> R. Dietze, S. F. Carvalho, L. C. Valli *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2001**, 65, 685-689.

<sup>195</sup> M. K. Wasunna, J. R. Rashid, J. Mbui *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2005**, 73, 871-876.

<sup>196</sup> S. Sundar, P. K. Sinha, S. A. Dixon *et al.*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2011**, 84, 892-900.

<sup>197</sup> P. M. Loiseau, S. Cojean et J. Schrével, *Parasite*, **2011**, 18, 115-119.

molécule est en équilibre entre sa forme protonée et sa forme non protonée au niveau de la fonction amine tertiaire. Cette forme non protonée est une base faible qui va pénétrer dans les compartiments acides présents chez le parasite comme l'acidocalcisome où elle se protonera, et aura plus de difficulté à revenir dans le cytosol favorisant une accumulation dans ce compartiment. Cependant aucune corrélation n'a été établie entre cette accumulation et son action leishmanicide.<sup>198,199</sup> L'absence de données depuis 2011 laisse à penser que le développement de cette molécule a été arrêté par GSK en raison d'une efficacité relative, d'une toxicité trop importante ou encore d'un possible changement de stratégie de cet industriel.

#### **1.1.2.2. Le fexinidazole.**

En parallèle des essais cliniques de phase IIb/III en cours contre le stade 2 de la THA à *T. b. gambiense*, le fexinidazole a montré qu'il possédait également des propriétés leishmanicide *in vitro*.<sup>200</sup> Il est rentré en 2013 en essais cliniques de phase IIb/III au Soudan contre la leishmaniose viscérale mais son développement a été arrêté pour manque d'efficacité (sur 14 patients seuls 3 n'ont pas rechutés, 6 mois après le traitement).<sup>201</sup> Son mécanisme d'action impliquerait tout comme chez *Leishmania* une bioactivation par une nitroréductase en des métabolites électrophiles toxique pour les parasites. En effet, des études *in vitro* sur des souches de *L. donovani* qui surexpriment une NTR de type I (NTR1) ont montré que l'activité antileishmanienne du fexinidazole est augmentée d'un facteur 15.<sup>200</sup>

### **1.1.3. Les nouvelles molécules en essais cliniques contre la MC.**

#### **1.1.3.1. Le fexinidazole.**

Les travaux pré-cliniques réalisés par Hoechst (aujourd'hui Sanofi) avaient montré que le fexinidazole était également actif sur *Trypanosoma cruzi*, parasite responsable de la maladie de Chagas. Alors que son développement avait été arrêté par cet industriel, le consortium DNDi a choisi de réévaluer ce dérivé de 5-nitroimidazole sur des souris infectées par des souches de *T. Cruzi* plus ou moins sensibles au benznidazole.<sup>202</sup> Dans chacun des tests, le fexinidazole a montré de meilleurs résultats avec des taux de guérison chez les souris supérieurs à 70%. Des essais pré-cliniques et cliniques de phase I ayant déjà été réalisés pour le fexinidazole contre la THA, il est rapidement entré en essais cliniques de phase II contre la maladie de Chagas, en Bolivie. Malheureusement, ces essais ont été interrompus pour des raisons de sécurité et de tolérance chez les patients traités, même s'il a montré une bonne efficacité chez

<sup>198</sup> A. M. Duenas-Romero, P. M. Loiseau et M. Saint-Pierre-Chazel, *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1768, 246-252.

<sup>199</sup> C. Lopez-Martin, J. M. Pérez-Victoria, L. Carvalho *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2008**, 52, 4030-4036.

<sup>200</sup> S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **2012**, 4, 119re1.

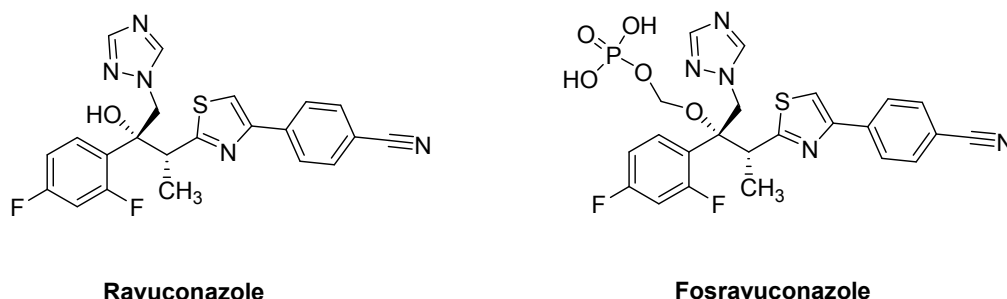
<sup>201</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/fexinidazole-vl/>, consulté en 06/2018.

<sup>202</sup> M. T. Bahia, A. F. Nascimento, A. L. Mazzeti *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, 58, 4362-4370.

les patients traités avec une faible dose.<sup>203</sup> En 2017, ce 5-nitroimidazole est à nouveau entré en essai clinique de phase II contre la maladie de Chagas, en Espagne, les résultats sont attendus pour 2019.<sup>204</sup>

### 1.1.3.2. Le fosravuconazole.

Le fosravuconazole est une molécule antifongique de la classe des azoles dont l'activité anti-*Trypanosoma cruzi* a été démontrée. Cette molécule est en réalité une prodrogue du ravuconazole, une autre molécule anti-fongique (Figure 31).<sup>205</sup> Leur mécanisme d'action antiparasitaire impliquerait l'inhibition de la biosynthèse d'ergostérol, un composé indispensable à la constitution de la membrane du parasite. Si les premiers résultats du fosravuconazole étaient prometteurs, ils ont démontré lors d'essais cliniques de phase II une perte d'efficacité à long terme chez des patients atteints par la phase chronique de la maladie de Chagas.<sup>206</sup> Un nouvel essai clinique de phase II est actuellement en cours afin d'évaluer l'association du benznidazole et du fosravuconazole.



**Figure 31 :** Structure du ravuconazole et de sa prodrogue, le fosravuconazole.

## 1.2. Essais pré-cliniques.

### 1.2.1. Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la LV.

S'il y a très peu de molécules étudiées en clinique contre la leishmaniose viscérale, il y en a également très peu à un stade de développement pré-clinique. Ainsi dans le portfolio actuel de la DNDi, on retrouve 5 composés en développement pré-cliniques incluant un dérivé d'oxaborole (DNDi-6148), un dérivé de nitroimidazole (DNDi-0690), un dérivé d'aminopyrazole (DNDi-5561), et deux molécules développées par GSK. Parmi elles, GSK-3186899/DDD853651 est un dérivé de pyrazolopyrimidine.<sup>207</sup>

Le dérivé d'oxaborole (DNDi-6148) provient, tout comme l'acoziborole, d'un partenariat entre DNDi et Anacor Pharmaceuticals initié en 2010. En 2016, cette molécule a été considérée comme un candidat très intéressant tant contre la leishmaniose viscérale que contre la leishmaniose cutanée, elle est alors entrée en phase pré-clinique. Si sa structure n'est pas encore disponible, les premiers résultats

<sup>203</sup> DNDi, <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>, consulté le 04/07/2018.

<sup>204</sup> S. Patterson et A. H. Fairlamb, *Curr. Med. Chem.*, **2018**, DOI: 10.2174/0929867325666180426164352.

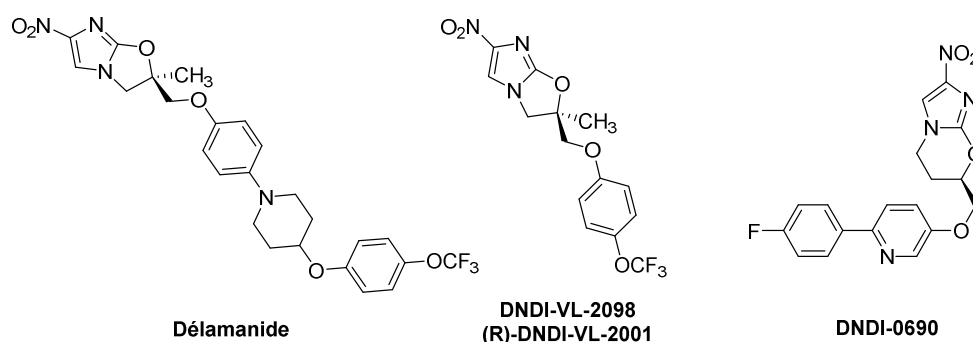
<sup>205</sup> J. A. Urbina, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **2015**, 62, 149-156.

<sup>206</sup> L. F. Diniz, A. L. Mazzeti, I. S. Caldas *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2018**, 62, e00401-e00418.

<sup>207</sup> C. E. Mowbray, *Drug Discovery for Leishmaniasis* édité par L. Rivas et C. Gil, **2017**, Chapitre 2, 24-36.



de toxicologie ont été obtenus en 2017 et son entrée en essais cliniques de phase I est désormais envisagée.<sup>208</sup> Ce benzoxaborole a par ailleurs été testé sur des modèles de hamster atteints de leishmaniose viscérale à *L. donovani* ou à *L. infantum*, pour lesquels la charge parasitaire dans le foie a ainsi été réduite respectivement de 100% et de 99,3% pour une dose de 50 mg/kg deux fois par jour pendant 5 jours et de 98,3% et 93,2% pour une dose de 25 mg/kg selon la même procédure.<sup>209</sup> De plus, dans cette même étude, l'absence de résistances croisées lors de tests *in vitro* sur des souches de *L. infantum* résistantes aux différentes molécules disponibles indique qu'il semble posséder un mécanisme d'action différent de ces molécules.



**Figure 32 :** Structure du délamamide (Delyba<sup>®</sup>), d'un analogue de 6-nitroimidazooxazole (DNDI-VL-2098) et d'un dérivé de 2-nitroimidazooxazine (DNDI-0690).

DNDI-0690 est un dérivé de 2-nitroimidazooxazine appartenant à la famille des 4-nitroimidazoles et développé par la DNDi, actuellement en essais précliniques mais qui sera prochainement en essai clinique de phase I (figure 32).<sup>210</sup> Cette série de molécules a été découverte lors du criblage sur *L. donovani* de nitroimidazoles antituberculeux dont fait partie le délamamide (Delyba<sup>®</sup>). DNDI-VL-2001, un analogue de 6-nitroimidazooxazole, est le plus actif de ces dérivés avec une réduction de la charge parasitaire dans le foie chez un modèle murin de leishmaniose viscérale de 99,9% pour une dose de 50 mg/kg/jour.<sup>211</sup> Malgré le criblage de 72 analogues, seul son énantiomère DNDI-VL-2098 a montré une meilleure efficacité et des propriétés pharmacocinétiques *in vivo* satisfaisantes pour évoluer en pré-clinique. Lors d'études ultérieures, un lien a été établi entre la dose, la durée du traitement et une toxicité testiculaire chez 3 espèces animales, stoppant immédiatement son développement.<sup>212</sup> Des travaux d'optimisation ont alors été réalisés jusqu'à obtenir DNDI-0690, un dérivé de 2-nitroimidazooxazine, qui réduit la parasitémie sur un modèle de hamster de leishmaniose viscérale de *L. infantum* de plus de 99,5% pour une dose de 12,5mg/kg/jour pendant 5 jours.<sup>213</sup> DNDI-0690 possède des propriétés

<sup>208</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/oxaborole-dndi-6148>, consulté en 06/2018

<sup>209</sup> M. Van Den Kerkhof, D. Mabilie, E. Chatelain *et al.*, *Drugs and Drug resistance*, **2018**, 8, 81-86.

<sup>210</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/nitroimidazole>, consulté en 06/2018.

<sup>211</sup> A. M. Thompson, P. D. O'Connor, A. Blaser *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 2530-2550

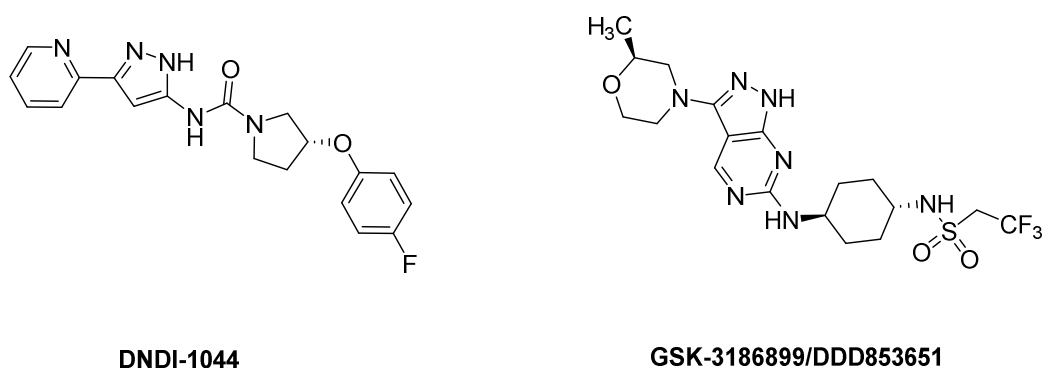
<sup>212</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/vl-2098/> consulté en 06/2018.

<sup>213</sup> A. M. Thompson, P. D. O'Connor, A. J. Marshall *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2018**, 61, 2329-2352.



pharmacocinétiques *in vivo* satisfaisantes et ne provoque pas de toxicité particulière, ce qui en fait un candidat très intéressant pour un développement futur.

Des études supplémentaires ont montré que DNDI-0690 était également très efficace sur un modèle hamster de leishmaniose viscérale à *L. donovani*, avec une réduction de la charge parasitaire supérieure à 99,8% pour une dose 12,5mg/kg/jour pendant 5 jours.<sup>209</sup>



**DNDI-1044**

**GSK-3186899/DDD853651**

**Figure 33 :** Structure d'un analogue d'aminopyrazole (DNDI-1044) et d'un dérivé de pyrazolopyrimidine (GSK3186899DDD853651).

DNDI-5561 est un dérivé d'aminopyrazole issu d'une collaboration initiée en 2015 entre DNDi et Takeda Pharmaceutical. Ils ont ainsi annoncé en avril 2018 que cette collaboration allait aboutir à des essais pré-cliniques puis des essais cliniques de phase I sur le meilleur composé de cette série.<sup>214</sup> C'est lors d'un criblage sur *Leishmania* d'une chimiothèque de Pfizer que cette série d'aminopyrazole a été découverte.<sup>215</sup> Des travaux d'optimisation ont par la suite été réalisés jusqu'à obtenir des composés très efficaces *in vivo* sur des modèles hamster de leishmaniose viscérale, comme DNDI-1044 (Figure 33), qui provoque une réduction de la parasitémie dans le foie de 95% pour une dose de 50 mg/kg/jour pendant 5 jours.<sup>216</sup> Des optimisations supplémentaires ont été réalisées par la DNDi avec le support de Takeda Pharmaceuticals, jusqu'à obtenir DNDI-5561 dont la structure exacte n'est pas encore connue.

Enfin, GSK3186899DDD853651 est un dérivé de pyrazolopyrimidine (Figure 33) qui a été découvert lors d'une campagne de criblage sur *L. donovani* à la suite d'une collaboration entre l'Université de Dundee et DNDi. Des travaux d'optimisation ont par la suite été réalisés entre l'unité de Drug Discovery de l'Université de Dundee et le laboratoire GSK localisé à Tres Cantos, en Espagne. Ce composé a montré des activités *in vitro* et *in vivo* très intéressantes notamment sur des modèles murins de leishmaniose viscérale. Ce composé est désormais entré en phase pré-clinique.<sup>216</sup>

<sup>209</sup> M. Van Den Kerkhof, D. Mabile, E. Chatelain *et al.*, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2018**, 8, 81-86.

<sup>214</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/dndi-5561>, consulté en 06/2018.

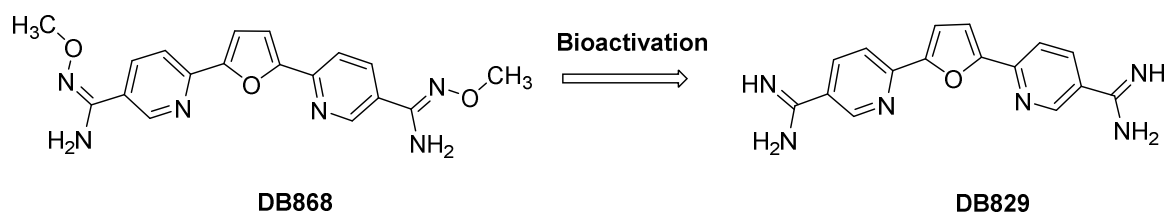
<sup>215</sup> C. E. Mowbray, *Drug Discovery for Leishmaniasis* édité par L. Rivas et C. Gil, **2017**, Chapitre 2, 24-36.

<sup>216</sup> C. E. Mowbray, S. Braillard, W. Speed *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 9615-9124.

### 1.2.2. Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la THA.

Si deux molécules sont actuellement bien avancées dans la phase de développement clinique contre la THA avec le fexinidazole (Phase III) et l'acoziborole (Phase IIb/III), il y a très peu de nouveaux composés en essais pré-cliniques. La DNDi n'en développe actuellement aucune, SCYX-1330682 et SCYX-1608210 étant des analogues d'acoziborole toujours en optimisation en cas de difficultés rencontrées avec ce dernier. Par ailleurs, depuis quelques années, de nombreuses études visant à découvrir un nouveau candidat administrable par voie orale et efficace sur les deux stades de la maladie et les deux espèces pathogènes (*T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*) ont vu le jour. Plusieurs familles de molécules semblent émerger avec des dérivés de diamidines, d'oxazolopyridine ou encore de thiazole-2-éthylamine.<sup>217</sup>

Les diamidines sont des molécules connues depuis longtemps pour leurs propriétés antiparasitaires, la pentamidine étant actuellement sur le marché contre la leishmaniose viscérale et la trypanosomiase humaine africaine mais présentant des propriétés néphrotoxiques. Des études ont ainsi été réalisées afin de découvrir un composé efficace mais ne présentant pas ces effets indésirables. DB868 a ainsi été identifié comme actif sur un modèle murin du stade II de la THA, soignant 100% des souris pour une administration par voie orale de 100 mg/kg pendant 5 jours.<sup>218</sup> DB868 agit comme une prodrogue, ce composé étant métabolisé en DB829 par les microsomes hépatiques humains par des réactions successives de *O*-déméthylation et de *N*-déshydroxylation (Figure 34).<sup>219</sup>



**Figure 34 :** Bioactivation par des microsomes hépatiques d'une diamidine protégée (DB868).

Une étude a par la suite été réalisée comparant l'administration intramusculaire (IM) de DB829 et l'administration orale de DB868 sur des modèles de singe (*Chlorocebus (Cercopithecus) aethiops*) atteints du stade 2 de THA par *T. b. rhodesiense*.<sup>220</sup> Ainsi, si l'administration par voie IM de 2,5 mg/kg/jour pendant 5 jours a soigné 100% des singes, l'administration par voie orale de DB868 a été moins efficace avec seulement 25% de taux de guérison pour des doses de 20 mg/kg/jour pendant 10 jours. DB829 est très intéressant *in vivo* sur les deux stades et les deux espèces pathogènes de la THA, cela fait de lui un bon candidat pour des essais cliniques bien que sa voie d'administration soit

<sup>217</sup> M. Berninger, I. Schmidt, A. Ponte-Sucre *et al.*, *Med. Chem. Commun.*, **2017**, 8, 1872-1890.

<sup>218</sup> T. Wenzler, D. W. Boykin, M. A. Ismail *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, 53, 4185-4192.

<sup>219</sup> J. H. Ansede, R. D. Voyksner, M. A. Ismail *et al.*, *Xenobiotica*, **2005**, 35, 221-226.

<sup>220</sup> J. K. Thuita, K. K. Wolf, G. A. Murilla *et al.*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2015**, 9, e0003409.



**Figure 35 :** Structure d'oxazolopyridines en développement clinique.

En parallèle, une autre équipe de recherche a criblé plus de 3 millions de composés sur *L. donovani*, *T. brucei* et *T. cruzi* et le composé A est également ressorti comme le plus actif et a mené à des travaux d'optimisation qui ont permis l'identification d'un nouveau composé C (figure 35).<sup>222</sup> Des tests *in vivo* sur des modèles murins de stade II de THA par *T. brucei* ont alors été réalisés, une administration par voie orale de 100 mg/kg quatre fois par jour pendant 7 jours a soigné 100% des souris. Ces résultats très prometteurs ont mené à l'évaluation pré-clinique de la toxicité de ce composé, actuellement en cours.



**Figure 36 :** Structure de deux dérivés en futur développement pré-clinique avec un noyau thiazole.

<sup>218</sup> T. Wenzler, D. W. Boykin, M. A. Ismail *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2009**, 53, 4185-4192.

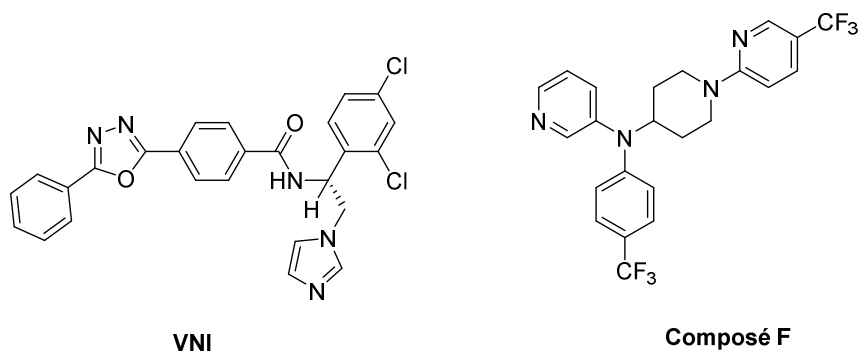
<sup>221</sup> H. B. Tatipaka, J. R. Gillespie, A. K. Chatterjee *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 828-835.

<sup>222</sup> S. Khare, A. S. Nagle, A. Biggart *et al.*, *Nature*, **2016**, 537, 229-233.

Enfin, très récemment, des dérivés de benzothiazole (Figure 36) ont également montré de très bons résultats *in vivo*, via une administration par voie orale sur des modèles murins de stade 1 et 2 de la THA par *T. b. brucei*.<sup>223,224</sup> Ils rentreront probablement en essais pré-cliniques, mais aucune donnée n'est pour l'instant disponible à ce sujet.

### 1.2.3. Les nouvelles molécules en essais pré-cliniques contre la maladie de Chagas.

Si pour la THA, peu de molécules sont en essais cliniques ou pré-cliniques, pour la maladie de Chagas, le constat est encore plus alarmant. En effet, seul le fexinidazole et une association benznidazole/fosravuconazole sont en essais cliniques de phase IIa tandis qu'aucune nouvelle molécule n'est actuellement en cours d'évaluation pré-clinique d'après le portfolio de la DNDi. Il existe à ce jour très peu de données quant à l'évolution de molécules en essais pré-cliniques contre la maladie de Chagas sachant qu'il y a également peu de résultats d'études *in vivo* sur des modèles animaux de *T. cruzi*.<sup>225</sup>



**Figure 37 :** Structures de deux inhibiteurs du cofacteur CYP51 de la 14- $\alpha$ -déméthylase.

Parmi les études en cours, de nombreuses s'intéressent à des inhibiteurs du cofacteur CYP51 de la 14- $\alpha$ -déméthylase. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane du trypanosome et précurseur de nombreuses molécules de signalisation notamment.<sup>226</sup> Il est désormais connu que l'inhibition de cette protéine amène à une activité trypanocide via un manque d'ergostérol dans la membrane du parasite et l'accumulation de stérols méthylés cytotoxiques.<sup>227</sup> Plusieurs molécules anti-fongiques de la famille des azolés comme le posaconazole ou le ravuconazole, ciblent ce cofacteur de la 14- $\alpha$ -déméthylase de *T. cruzi* et ont ainsi une activité anti-*Trypanosoma*. Le posaconazole était en essais cliniques de Phase II contre la maladie de Chagas, mais il s'est avéré moins efficace que le benznidazole chez des patients infectés par le stade chronique de la

<sup>223</sup> D. A. Patrick, J. R. Gillepsie, J. McQueen et al., *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 957-971.

<sup>224</sup> S. Russell, R. Rahmani, A. J. Jones et al., *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 9686-9720.

<sup>225</sup> <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio>, consulté en 06/2018.

<sup>226</sup> M. T. Bahia, L. de Figueiredo Diniz et V. C. Furtado Mosqueira, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2014**, 23, 1225-1237

<sup>227</sup> J. A. Maertens, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2004**, 10, 1–10.

maladie et son développement a été arrêté.<sup>228</sup> Par ailleurs, la possible inhibition de cytochromes P450 comme le CYP3A4 est une limitation de cette classe de molécules, plus particulièrement dans le cadre de traitements par association de médicaments. Les interactions médicamenteuses sont une autre limite, ces molécules vont inhiber l'activité métabolique des cytochromes provoquant une augmentation de la concentration du médicament chez le patient menant à une toxicité.<sup>229</sup> Récemment, VNI (figure 37), un inhibiteur de CYP51 a montré une bonne efficacité sur le stade aigu et le stade chronique de la maladie sur des modèles de souris pour une dose de 25 mg/kg pendant 30 jours.<sup>230</sup> Avec une absence de toxicité chez les souris et des propriétés pharmacocinétiques favorables, ce composé semble idéal pour une entrée en essais cliniques. Le composé D (figure 34) est également un inhibiteur de CYP51, il a montré une meilleure efficacité *in vivo* pour une dose de 20 mg/kg/ jour pendant 20 jours que le benzinidazole (100 mg/kg) sur un modèle murin de maladie de Chagas au stade chronique.<sup>231</sup>

## **2. Focus sur les composés nitroaromatiques, historique.**

Contrairement à une idée assez répandue, les composés nitroaromatiques sont aujourd'hui assez largement utilisés pour traiter un large éventail de pathologies allant de la maladie de Parkinson aux maladies cardio-vasculaires en passant par les troubles du sommeil ou certains cancers hormono-dépendants (Figure 38).<sup>232,233</sup> Parmi les médicaments sur le marché possédant un groupement NO<sub>2</sub> aromatique on retrouve : la tolcapone et l'entacapone, deux inhibiteurs de la catéchol O-méthyltransférase utilisés contre la maladie de Parkinson (en rouge dans la figure 36) ; le nilutamide et le flutamide, des anti-cancéreux anti-androgènes (en bleu) ; le nimésulide, un anti-inflammatoire non-stéroïdien inhibiteur de COX2 principalement (en orange) ; le nitrazépam et ses analogues, des hypnotiques et antiépileptiques de la famille des benzodiazépines (en vert) ; la ranitidine, un antihistaminique H2 (en violet) ; la nifédipine et ses analogues, des dérivés de dihydropyridine utilisés contre l'hypertension artérielle (en rose); l'acénocoumarol, un anticoagulant antivitaminique K (en gris) et l'azathioprine, un immunosuppresseur (en noir). Leur caractéristique principale est la présence d'un groupement nitro sur un cycle aromatique ou hétéroaromatique. Ce groupement possède des propriétés originales, en effet il est polaire, fortement électro-attracteur et est capable de former des liaisons hydrogènes avec son environnement.

<sup>228</sup> C. A. Morillo, H. Waskin, S. Sosa-Estani *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2017**, 69, 939-947.

<sup>229</sup> S. Cronin et P. H. Chandrasekar, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2010**, 65, 410-416.

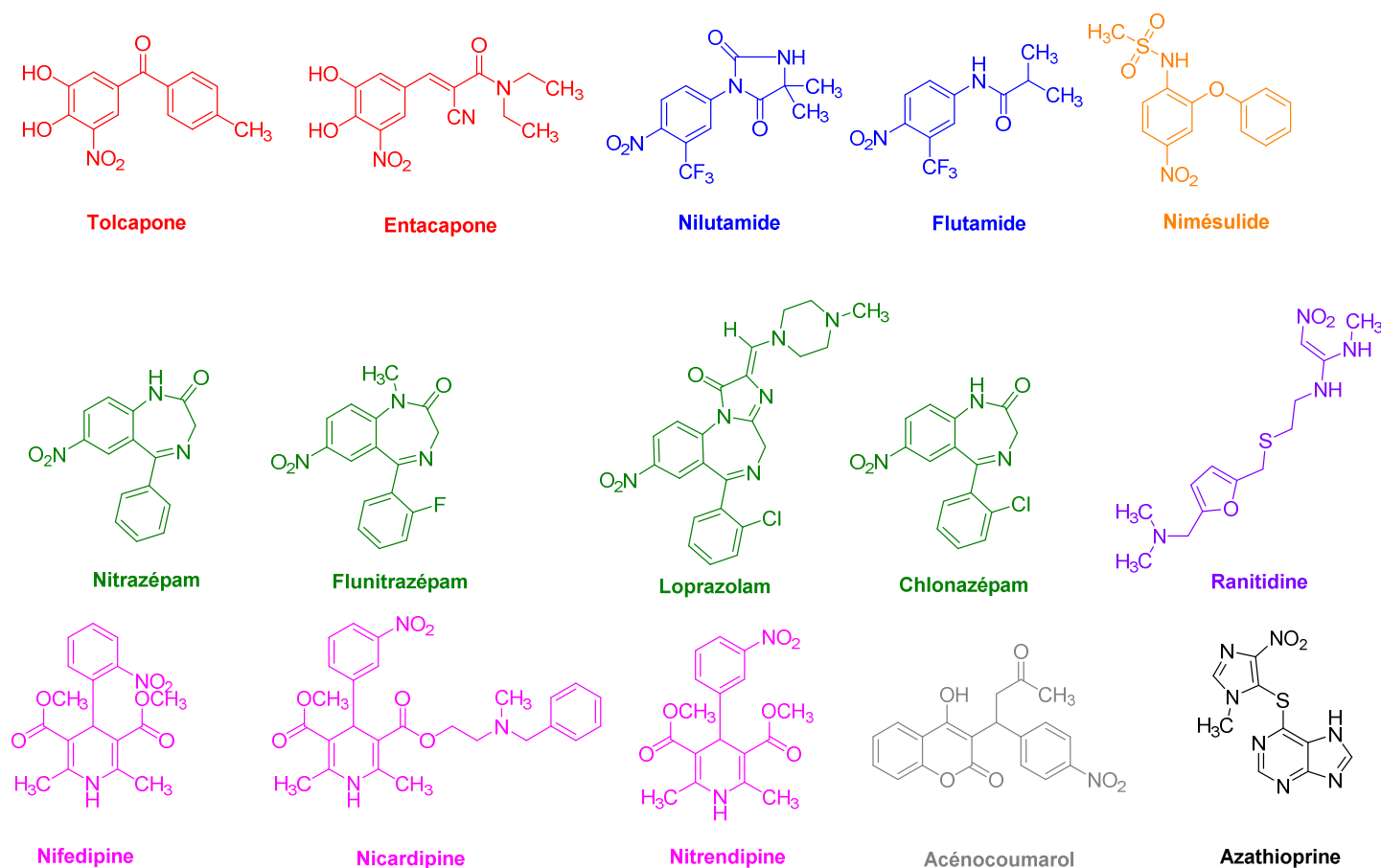
<sup>230</sup> F. Villalta, M. C. Dobish, P. N. Nde *et al.*, *J. Infect. Dis.*, **2013**, 208, 504-511.

<sup>231</sup> M. Keenan, J. H. Chaplin, P. W. Alexander *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 10158-10170.

<sup>232</sup> D. D. Truong, *Clin. Interv. Aging*, **2009**, 4, 109-113.

<sup>233</sup> E. M. Sorkin, S. P. Clissold et R. N. Brogden, *Drugs*, **1985**, 30, 182-274.

## Chapitre 2 : Molécules antikinétoplastidés en développement et bioactivation de composés nitroaromatiques par les nitroréductases parasitaires.



**Figure 38 :** Structures des médicaments sur le marché contenant un groupement nitro aromatique.

L'utilisation de dérivés nitroaromatiques en tant qu'anti-infectieux remonte quant à lui au début des années 1950 avec la découverte de l'azomycine, un 2-nitroimidazole.<sup>234</sup> Extrait de la bactérie *Streptomyces eurocidius*, cette molécule possède une bonne activité contre la trichomonase, une parasitose due à *Trichomonas vaginalis*. C'est le point de départ de nombreuses recherches qui aboutiront quelques années plus tard à la découverte d'un 5-nitroimidazole de synthèse, encore plus puissant que l'azomycine, et désormais mondialement connu : le métronidazole.<sup>235</sup> Depuis, plusieurs familles de composés nitroaromatiques sont présentes sur le marché pour combattre un large spectre de maladies infectieuses. On retrouve principalement les 5-nitroimidazoles, les 2-nitroimidazoles, les 5-nitrofuranes et les 5-nitrothiazoles.<sup>236</sup>

<sup>234</sup> S. Nakamura, *Pharm. Bull.*, **1955**, 3, 379-383.

<sup>235</sup> R. J. Anderson, P. W. Groundwater, A. Todd *et al.*, *Antibacterial Agents : Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications*, 1st ed., John Wileys and sons, **2012**, 85-101.

<sup>236</sup> C. W. Ang, A. M. Jarrad, M. A. Cooper *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 7636-7657.

## 2.1. Les 5-nitroimidazoles.

L'histoire des 5-nitroimidazoles en thérapeutique commence donc avec la découverte du métronidazole en 1960 par Rhône-Poulenc, en tant que molécule anti-*Trichomonas*. Entre les années 1960 et 1970, les recherches permettront de découvrir que le métronidazole n'est pas seulement une molécule antiparasitaire active contre *Trichomonas* mais aussi un antibactérien efficace aussi bien contre des bactéries anaérobies à Gram positif ou à Gram négatif.<sup>237</sup> Il est également capable de tuer les parasites flagellés responsables de la giardiose notamment, une maladie infectieuse du tube digestif.<sup>238</sup> Aujourd'hui, le métronidazole est commercialisé sous le nom de Flagyl®. Ce médicament est toujours présent sur la liste de médicaments essentiels de l'OMS malgré son développement il y a plus de 55 ans. Il est administrable par voie orale, intraveineuse ou cutanée, selon la pathologie traitée. De plus, il provoque peu d'effets secondaires chez les patients traités qui sont majoritairement des perturbations du tractus gastro-intestinal et des effets antabuses comprenant nausées, rougissements, vertiges, douleurs thoraciques voire confusion mentale.

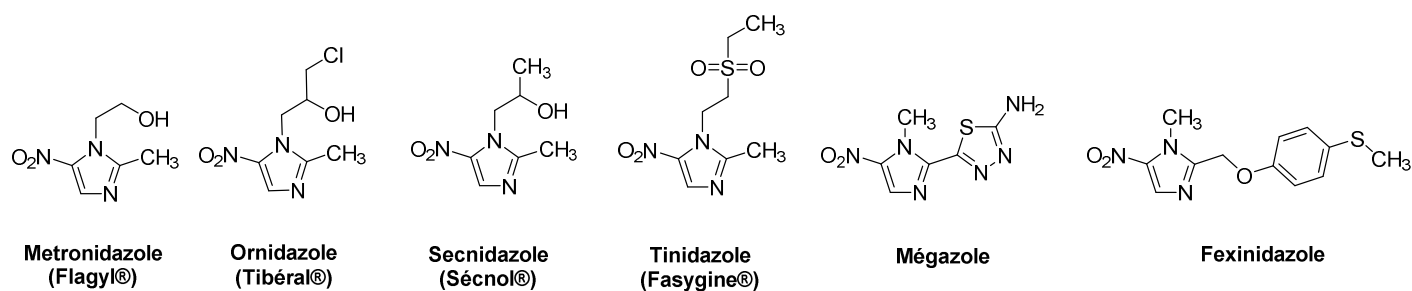


Figure 39 : Structure des dérivés de 5-nitroimidazoles aux propriétés anti-infectieuses.

Si le métronidazole a été découvert en 1960, une seconde génération de 5-nitroimidazoles a vu le jour entre 1960 et 1970 avec le développement de l'ornidazole, du secnidazole et du tinidazole.<sup>239,240</sup> Ces analogues structuraux du métronidazole diffèrent seulement par la nature de la chaîne alkyle portée par l'azote en position  $\alpha$  du groupement  $\text{NO}_2$ . Ils possèdent le même spectre d'action que ce dernier avec une meilleure efficacité et sont tous administrables par voie orale.

Le mégazole a également été découvert dans les années 1960. Il est un peu différent au niveau structural avec la substitution de la position 2 du 5-nitroimidazole par un motif thiadiazole. Si ses activités sur *T. cruzi* et *T. brucei* étaient très prometteuses, son développement a été rapidement stoppé à cause de l'observation d'effets mutagènes et génotoxiques *in vivo*.<sup>241</sup> Enfin le fexinidazole fait aussi

<sup>237</sup> S. Lofmark, C. Edlund et C. Nord, *Clin. Infect. Dis.*, **2010**, 50, S16-S23.

<sup>238</sup> J. Samuelson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 1533-1541.

<sup>239</sup> M. Skold, H. Gnärpe et L. Hillstrom, *Br. J. Vener. Dis.*, **1977**, 53, 44-48.

<sup>240</sup> D. Videau, G. Niel, A. Siboulet *et al.*, *Br. J. Vener. Dis.*, **1978**, 54, 77-80.

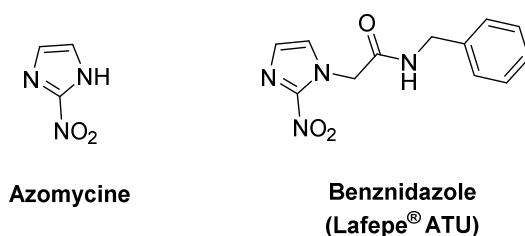
<sup>241</sup> F. Nessler, S. Brugier, M-A. Mouriès *et al.*, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **2004**, 560, 147-158.



partie de cette famille de 5-nitroimidazoles, il est actuellement en essais cliniques à la fois pour la THA et pour la MC. Les structures de ces différents dérivés de 5-nitroimidazole sont représentées dans la figure 39.

## 2.2. Les 2-nitroimidazoles.

Si la découverte de l'azomycine, un 2-nitroimidazole, en tant qu'agent anti-infectieux a été réalisée dans les années 1950, sa synthèse n'a été réussie que 10 plus tard.<sup>242</sup> Des études de pharmacomodulation anti-infectieuse ont alors été réalisées jusqu'à découvrir des molécules actives contre la tuberculose principalement.<sup>243</sup> Malheureusement en raison de la capacité des cellules humaines à métaboliser ces dérivés en dérivés toxiques provoquant des effets indésirables, leur développement a rapidement été abandonné.<sup>244</sup> Le benznidazole (Lafepe®) est aujourd'hui le seul dérivé de 2-nitroimidazole utilisé en tant que médicament dans le traitement la maladie de Chagas (Figure 40).



**Figure 40 :** Structure de 2-nitroimidazoles aux propriétés anti-infectieuses.

## 2.3. Les 5-nitrofuranes.

Les 5-nitrofuranes ont aussi été découverts dans les années 1950 avec la nitrofurazone, un dérivé actif contre les deux espèces pathogènes de la THA.<sup>245</sup> Si ses activités anti-*Trypanosoma in vitro* étaient prometteuses, son développement a été stoppé pendant les essais cliniques en raison d'une efficacité contestable et de lourds effets secondaires incluant des lésions neurologiques.<sup>246</sup> Par ailleurs, la nitrofurantoïne a été découverte dans les années 1940, ce composé nitré possédant un motif semicarbazone (Figure 41) est utilisé contre les infections du tractus urinaire.<sup>247</sup> Il a été très utilisé jusque dans les années 1945, date à laquelle de nouveaux composés tels que les  $\beta$ -lactames le lui ont été préféré. Cependant à partir des années 2000, en raison de l'apparition de résistances et de l'absence de nouveaux composés, un retour de l'utilisation de la nitrofurantoïne a été observé.

<sup>242</sup> G. C. Lancini et L. Lazzari, *Experientia*, **1965**, 21, 83.

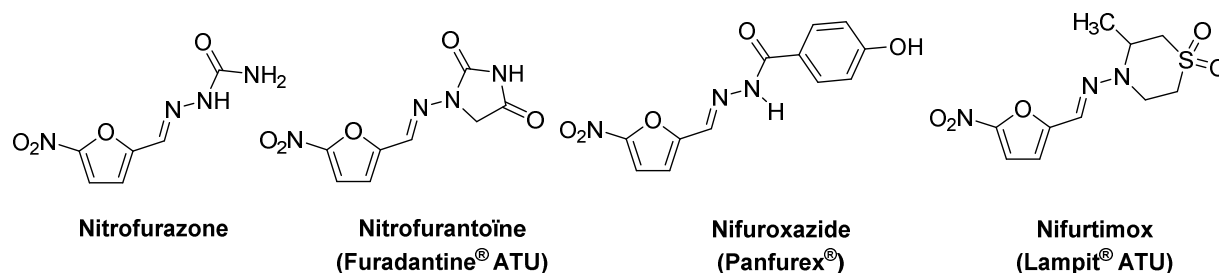
<sup>243</sup> B. Cavalleri, R. Ballotta, V. Arioli *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1973**, 16, 557-560.

<sup>244</sup> R. Sharma, *Curr. Radiopharm.*, **2011**, 4, 379-393.

<sup>245</sup> J. Williamson, *Exp. Parasitol.*, **1962**, 12, 323-367.

<sup>246</sup> S. Patterson et S. Wyllie, *Trends Parasitol.*, **2014**, 30, 289-298.

<sup>247</sup> A. Huttner, E. M. Verhaegh, S. Harbarth *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother.*, **2015**, 70, 2456-2564.



**Figure 41** : Structure des dérivés de 5-nitrofuranes aux propriétés anti-infectieuses.

Le Nifuroxazide (Panfurex®) est un analogue structural de la nitrofurantoïne possédant un motif benzamide. Il a été découvert en 1966 et breveté par M. Carron aux Etats-Unis.<sup>248</sup> Aujourd'hui, il est toujours utilisé pour le traitement des diarrhées et des colites infectieuses peu sévères. Sa très faible réactivité et son incapacité à diffuser dans les systèmes et tissus organiques chez l'homme en font un dérivé très intéressant comme antiseptique intestinal. En 2016, des essais cliniques ont démontré que l'administration par voie orale d'une gélule de nifuroxazide était plus efficace que les traitements probiotiques utilisés contre les diarrhées aiguës.<sup>249</sup>

Enfin le nifurtimox est un autre dérivé de 5-nitrofurane dont la découverte s'est faite en 1967. Il est utilisé quant à lui dans le traitement de la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine au même titre que le benznidazole, comme évoqué dans le chapitre 1.

#### 2.4. Les 5-nitrothiazoles.

La découverte des 5-nitrothiazoles en tant qu'agent anti-infectieux a eu lieu dans les années 1960/1970, avec le nitazoxanide qui a été développé par J-F. Rossignol pour ses activités antiparasitaires et antihelminthiques.<sup>250</sup> Des études supplémentaires ont permis de se rendre compte que cette molécule possède un large spectre d'action. En effet elle est capable de tuer de nombreux agents infectieux qu'ils soient des protozoaires comme *Trichomonas* ou des bactéries anaérobies comme *Clostridium difficile*.<sup>251,252</sup> Ce nitrothiazole est un dérivé d'acide acétylsalicylique couplé par une liaison amide à un 2-amino-5-nitrothiazole, il est par ailleurs utilisé pour traiter la cryptosporidiose, une maladie intestinale grave chez des patients immunodéprimés. Il possède aujourd'hui une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) sous le nom d'Alinia et est administrable par voie orale.

Le ténonitrozole est un analogue du nitazoxanide avec un noyau 5-nitrothiazole couplé à un thiophène via une liaison amide (Figure 42). Cette molécule est un médicament administrable par voie orale pour le traitement de la trichomonase urogénitale.

<sup>248</sup> Brevet, Carron Maurice Claude Ernest, US3290213, **1961**.

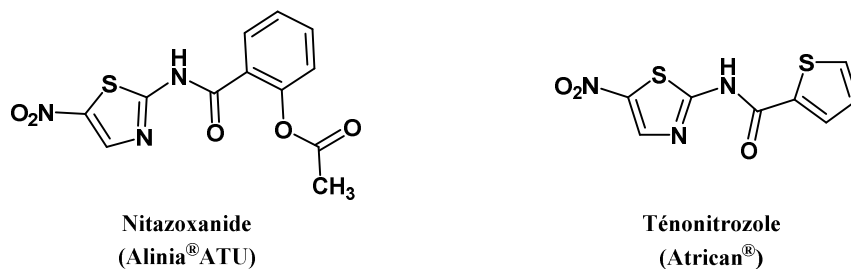
<sup>249</sup> B. Begovic, S. Ahmedtagic, L. Calkic et al., *Mater. Sociomed.*, **2016**, 28, 454-458.

<sup>250</sup> J. F. Rossignol et R. Cavier, *Chem. Abstr.*, **1975**, 83, 28216.

<sup>251</sup> J. F. Rossignol, H. Maisonneuve et Y. W. Cho, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **1984**, 22, 63-72.

<sup>252</sup> C. S. McVay et R. D. Rolee, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, 44, 2254-2258.

Elle a obtenu son autorisation de mise sur le marché en 1997 mais n'est plus commercialisée depuis 2012 en raison de l'arrêt de sa production par le Laboratoire Innotech International.



**Figure 42 :** Structure des dérivés de 5-nitrothiazoles aux propriétés anti-infectieuses.

Il y a donc de nombreuses molécules constituées d'un groupement  $\text{NO}_2$  qui sont utilisées en thérapeutique, et plus particulièrement en infectiologie. Des études récentes ont été réalisées afin de comprendre le mécanisme d'action anti-infectieux de ces composés nitroaromatiques. Il impliquerait des enzymes capables de bioactiver ces molécules en métabolites cytotoxiques.

### 3. Mécanisme d'action antiparasitaire des dérivés nitroaromatiques.

#### 3.1. Nitroréductases bactériennes et nitroréductases parasitaires.

Les nitroréductases ont été décrites pour la première fois dans les années 1960, dans des bactéries capables de réduire deux composés nitrés, le chloramphénicol et l'acide *p*-nitrobenzoïque, en leurs analogues aminés.<sup>253,254</sup> Depuis, l'intérêt porté à ces enzymes n'a cessé de croître et a permis l'identification et la caractérisation d'un grand nombre de nitroréductases issues de tous types d'organismes : dans des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, aérobies ou anaérobies, phototrophes ou hétérotrophes ; dans des micro-organismes unicellulaires procaryotes (archéobactéries) ou dans des organismes eucaryotes.<sup>255</sup> Par ailleurs, ces nitroréductases sont absentes des cellules de mammifères.

Malgré de nombreuses recherches, le rôle exact de ces nitroréductases dans ces différents organismes n'est toujours pas bien connu. Il y a très peu de composés présents dans la nature possédant un groupement nitroaromatique, parmi ceux-ci on retrouve le chloramphénicol (*Streptomyces venezuelae*)<sup>256</sup>, la nitropyolutéorine (*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>257</sup>, l'oxypyrrrolnitrine (*Pseudomonas pyrocinia*)<sup>258</sup>, la phidolopine (*Phidolopora pacifica*)<sup>259</sup> et l'azomycine (*Streptomyces eurocidicus*) (Figure 43). Ces composés ont été isolés depuis ces micro-organismes et possèdent des propriétés antibiotiques ou antifongiques, le

<sup>253</sup> A. K. Saz et M. L. Martinez, *J. Biol. Chem.*, **1956**, 223, 285-292.

<sup>254</sup> N. J. Cartwright et R. B. Cain, *Biochem. J.*, **1959**, 73, 305-314.

<sup>255</sup> M. D. Roldan, E. Pérez-Reinado, F. Castillo *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, 32, 474-500.

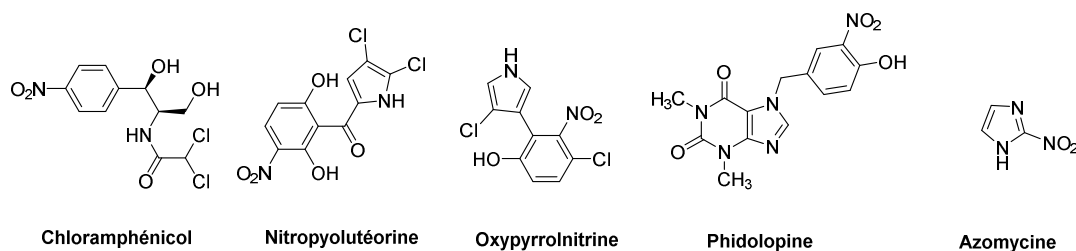
<sup>256</sup> Z. U. Ahmed et L. C. Vining, *J. Bacteriol.*, **1983**, 154, 239-244.

<sup>257</sup> T. Ohmori, S. Hagiwara, A. Ueda *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **1978**, 42, 2031-2036.

<sup>258</sup> M. Hashimoto et K. Hattori, *Chem. Pharm. Bull.*, **1966**, 14, 1314-1316.

<sup>259</sup> M. Tischler, S. W. Ayer et R. J. Andersen, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1986**, 84, 43-45.

chloramphénicol étant par ailleurs toujours présent sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS et utilisé dans le traitement de certaines méningites et du choléra.



**Figure 43 :** Structure de composés naturels possédant un groupement nitroaromatique.

La grande majorité des molécules possédant un groupement nitroaromatique a une origine synthétique et provient plus particulièrement de l'industrie phytosanitaire (exemple des pesticides parathion ou du dinosèbe), ou de l'industrie militaire (exemple des explosifs 2,4,6-trinitrotoluène TNT et 2,4,6-trinitrophénol).<sup>254</sup> Les composés nitroaromatiques ne sont donc pas les substrats physiologiques de ces nitroréductases, leur présence dans l'environnement provoquée par l'Homme n'existant seulement que depuis quelques dizaines d'années.

Ainsi, la fonction première de ces enzymes a pu être modifiée *via* des mutations dans le but de dégrader ces nouvelles entités chimiques et survivre dans des milieux pollués.<sup>260</sup> Plusieurs hypothèses ont été émises dans le but de comprendre le rôle physiologique de ces nitroréductases bactériennes :

- 1) Les nitroréductases pourraient jouer un rôle de détoxification en ayant la capacité de réduire une large gamme de substrats allant des flavines aux quinones en passant par différents types de composés nitroaromatiques. Cependant certaines de ces nitroréductases sembleraient spécialisées dans la dégradation de composés nitroaromatiques, comme le nitrobenzène ou le chloronitrobenzène.<sup>261, 262</sup>
- 2) Les nitroréductases participeraient au mécanisme de défense contre le stress oxydant. Pour étayer cette hypothèse, il a été prouvé que NfsA, une nitroréductase de *Escherichia coli*, est régulée par le système SoxRS, qui est lui-même impliqué dans le contrôle de la réponse au stress oxydant chez cette bactérie.<sup>263</sup>
- 3) Les nitroréductases pourraient faire partie d'une voie métabolique d'équilibre d'oxydo-réduction en cas d'excès de pouvoir réducteur. Par exemple, les quinones seraient réduites par ces enzymes en hydroxyquinones dans la bactérie, qui par la suite réduiraient des groupements azoïques dans le milieu extracellulaire.<sup>264</sup>

<sup>254</sup> N. J. Cartwright et R. B. Cain, *Biochem. J.*, **1959**, 73, 305-314.

<sup>260</sup> K. N. Timmis et D. H. Pieper, *Trends Biotechnol.*, **1999**, 17, 201-204.

<sup>261</sup> C. C. Somerville, S. F. Nishino et J. C. Spain, *J. Bacteriol.*, **1995**, 177, 3837-3842.

<sup>262</sup> Y. Xiao, J. F. Wu, H. Liu et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 73, 166-171.

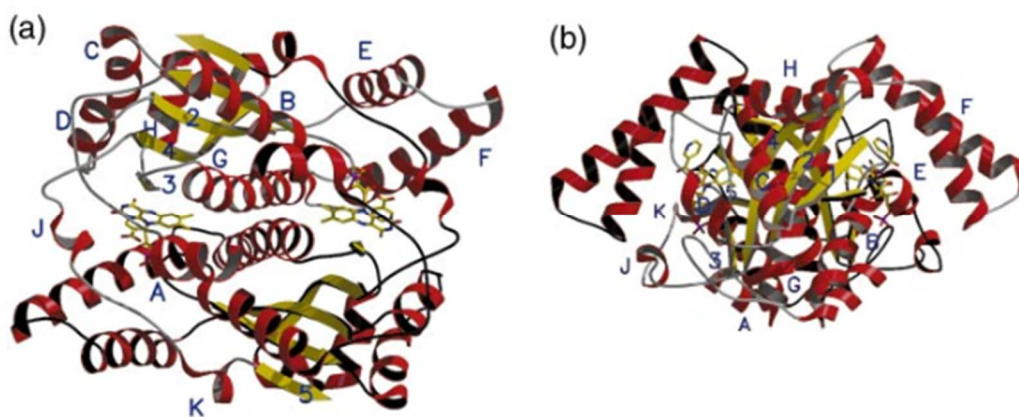
<sup>263</sup> J. Rau et A. Stolz, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 3448-3455.

<sup>264</sup> S. I. Liochev, A. Hausloden et I. Fridovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 3537-3539.

Si leur rôle physiologique reste pour l'heure une énigme, le potentiel d'utilisation de ces nitroréductases n'en demeure pas moins intéressant dans le domaine environnemental et clinique. La bioremédiation englobe toutes les techniques de dépollution de l'environnement *via* des organismes, des plantes, des champignons ou des enzymes qu'ils produisent. Plusieurs organismes sont déjà connus pour réduire les groupements nitro du TNT que cela soit dans des conditions anaérobies ou aérobies.

Des efforts sont aujourd'hui réalisés pour développer des plantes transgéniques portant des gènes de nitroréductase afin de dégrader les composés nitroaromatiques présents dans l'environnement.<sup>265</sup> D'un autre côté, les nitroréductases sont également utilisées dans le domaine clinique et plus particulièrement en cancérologie. La technique ADEPT (Antibody directed enzyme prodrug therapy) couple une nitroréductase bactérienne (le plus souvent provenant d'*Escherichia coli*) avec un anticorps qui va cibler des cellules tumorales.<sup>266,267</sup> Par la suite, une prodrogue portant un groupement nitroaromatique est administrée. Ce groupement sera converti en un produit très cytotoxique qui tuera toutes les cellules tumorales reconnues par l'anticorps. Cette stratégie existe également dans des systèmes couplant le gène de la nitroréductase bactérienne avec des complexes d'ADN ou des vecteurs viraux.<sup>268</sup>

Les nitroréductases bactériennes (NTR) sont des flavoenzymes NAD(P)H dépendantes qui catalysent la réduction de groupements NO<sub>2</sub> de molécules nitroaromatiques ou polynitroaromatiques. Ces enzymes possèdent une flavine mononucléotide (FMN/ FMNH<sub>2</sub>) ou une flavine adénine dinucléotide (FAD/FADH<sub>2</sub>) en tant que groupement prosthétique. Les NTRs bactériennes sont généralement des homodimères de 24 à 30 kDa par sous-unité (Figure 44).<sup>255</sup>



**Figure 44 :** Structure de la nitroréductase NfsB d'*Escherichia Coli*, (a) vue vers le bas du double axe, (b) rotation de 90° depuis (a). Les alpha hélices sont représentées en rouge et numérotées de A à K tandis que les feuillets bêta sont représentés en jaune et sont numérotés de 1 à 5. Le groupement FMN et l'acide nicotinoïque sont représentés sous forme de structures chimiques.<sup>269</sup>

<sup>265</sup> M. Kurumata, M. Takahashi, A. Sakamotoa *et al.*, *Z. Naturforsch.*, **2005**, 60, 272-278.

<sup>266</sup> R. J. Knox, F. Friedlos et M. P. Boland, *Cancer Metast. Rev.*, **1993**, 12, 195-212.

<sup>267</sup> S. K. Sharma et K. D. Bagshawe, *Adv. Deliv. Drugs Rev.*, **2017**, 118, 2-7.

<sup>268</sup> A. N. Lukashev, C. Fuerer, M. J. Chen *et al.*, *Human Gene Ther.*, **2005**, 16, 1473-1483.

<sup>255</sup> M. D. Roldan, E. Pérez-Reinado, F. Castillo *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, 32, 474-500.

<sup>269</sup> A. L. Lovering, E. I. Hyde, P. F. Searle, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **2001**, 309, 203-213.

Les structures cristallines de nombreuses nitroréductases bactériennes ont été déterminées, chez *E. Coli* notamment.<sup>270, 271</sup> Toutes ces données ont permis de découvrir que les nitroréductases sont des protéines globulaires qui ont des domaines constants pour la liaison avec leurs groupements prosthétiques (FMN ou FAD), l'interaction avec leurs cofacteurs respectifs (NAD(P)H) et les substrats nitroaromatiques. Elles sont composées de 5 feuillets *béta* entourés d'hélices *alpha* et possèdent une poche entre les deux monomères de l'enzyme où les groupements FMN ou FAD vont se loger *via* des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes.

A ce jour, les structures de nitroréductases obtenues par diffraction aux rayons X sont seulement des structures de nitroréductases bactériennes. Ainsi, bien que certaines nitroréductases aient été découvertes chez des protozoaires comme *Leishmania* ou *Trypanosoma*, leur structure n'est pas encore connue. Cependant, les nitroréductases parasitaires comme les nitroréductases bactériennes peuvent se classer en deux types : les NTRs de type I vont catalyser des réductions à 2 électrons tandis que les NTRs de type II vont catalyser des réductions à 1 seul électron.

### **3.2. Les deux voies de réduction du groupement NO<sub>2</sub> par les nitroréductases.**

#### **3.2.1. Réduction à 2 électrons, par les nitroréductases de type I.**

Les nitroréductases de type I ne sont pas sensibles à la présence d'oxygène ; elles vont catalyser la réduction du groupement NO<sub>2</sub>, en milieu aérobie ou anaérobie, *via* le transfert de deux électrons depuis NAD(P)H et former des intermédiaires nitroso, hydroxylamine puis amine.<sup>272,273</sup> Les nitroréductases bactériennes de type I peuvent par ailleurs être classées en deux groupes selon leur similarité avec les deux nitroréductases d'*Escherichia Coli* (NfsA et NfsB) : un groupe A où les nitroréductases ont NADPH en tant que cofacteur et un groupe B où les nitroréductases peuvent avoir NADH ou NADPH en tant que donneur d'électrons. Cette distinction n'existe pas pour les nitroréductases d'origine parasitaire. Ces nitroréductases de type I catalysent la réduction du NO<sub>2</sub> *via* un mécanisme bi-bi ping-pong faisant intervenir le cofacteur (NAD(P)H) et un groupement prosthétique (FMN) comme représenté dans la figure 45.

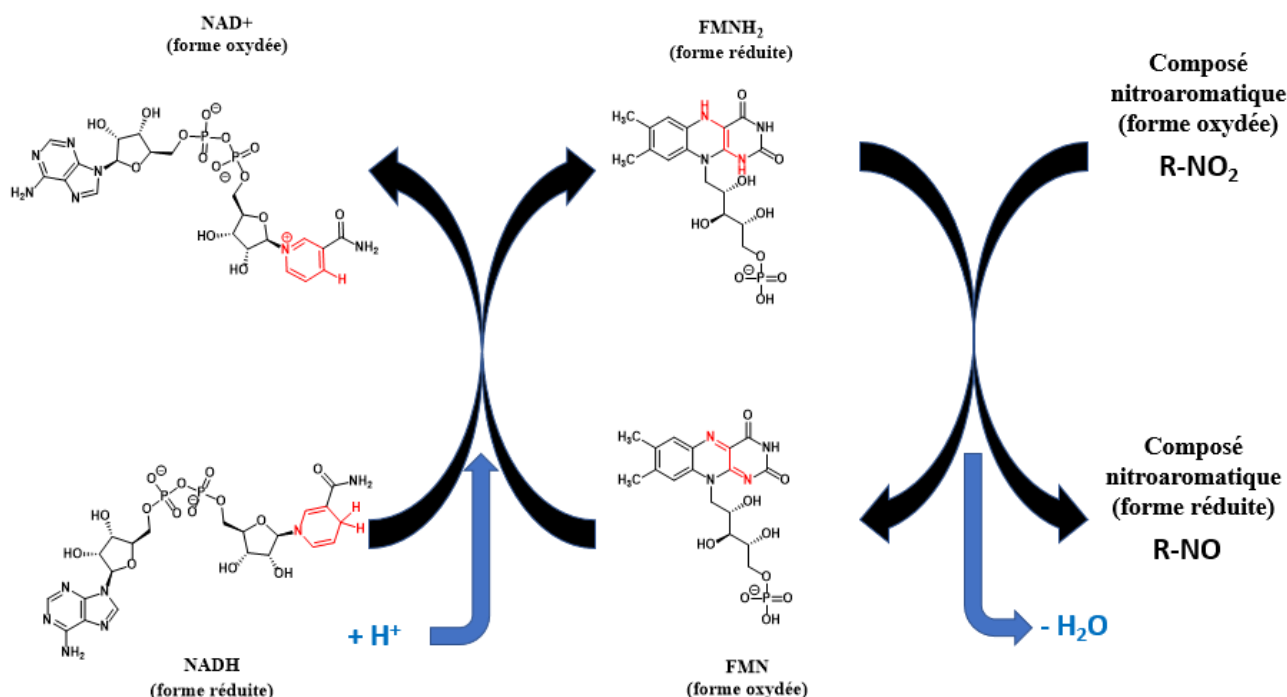
<sup>270</sup> J. J. Tanner, B. Lei, S. C. Tu *et al.*, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13531-13539.

<sup>271</sup> P. R. Race, A. L. Lovering, S. A. White *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **2007**, 368, 481-492.

<sup>272</sup> F. J. Peterson, R. P. Mason, J. Hovsepian *et al.*, *J. Chem. Biol.*, **1979**, 254, 4009-4014.

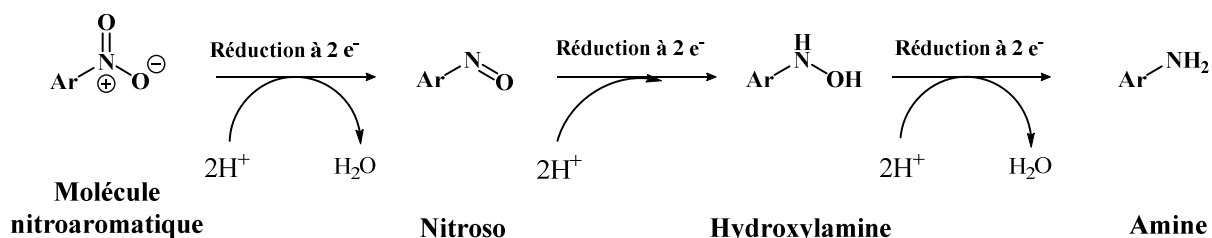
<sup>273</sup> C. Bryant, L. Hubbard et W. D. McElroy, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 4126-4130.





**Figure 45 :** Schéma postulé de la réduction d'un groupement nitroaromatique par une nitroréductase de type I possédant NADH en tant que cofacteur.

NAD(P)H va s'oxyder en NAD(P)<sup>+</sup> et transférer deux électrons à FMN qui sera alors réduite en FMNH<sub>2</sub>. FMNH<sub>2</sub> va alors s'oxyder en FMN et transférer deux électrons au composé nitroaromatique qui sera alors réduit en dérivé nitroso (figure 43). Ce groupement FMN sera ensuite capable de recevoir à nouveau deux électrons de NADH et ainsi continuer le cycle catalytique.<sup>255</sup> Au niveau du composé nitroaromatique, les réductions successives à deux électrons du groupement nitro vont générer un premier intermédiaire nitroso qui sera lui-même transformé en intermédiaire hydroxylamine à la suite d'une seconde réduction à deux électrons. Finalement une dernière réduction va générer l'amine aromatique, dernière molécule de cette séquence réductionnelle (Figure 46). L'intermédiaire nitroso est rarement détecté car la seconde réduction est beaucoup plus rapide que la première, menant rapidement au dérivé hydroxylamine.<sup>274</sup>



**Figure 46 :** Equation bilan de la bioactivation d'une molécule nitroaromatique par une NTR de type 1.

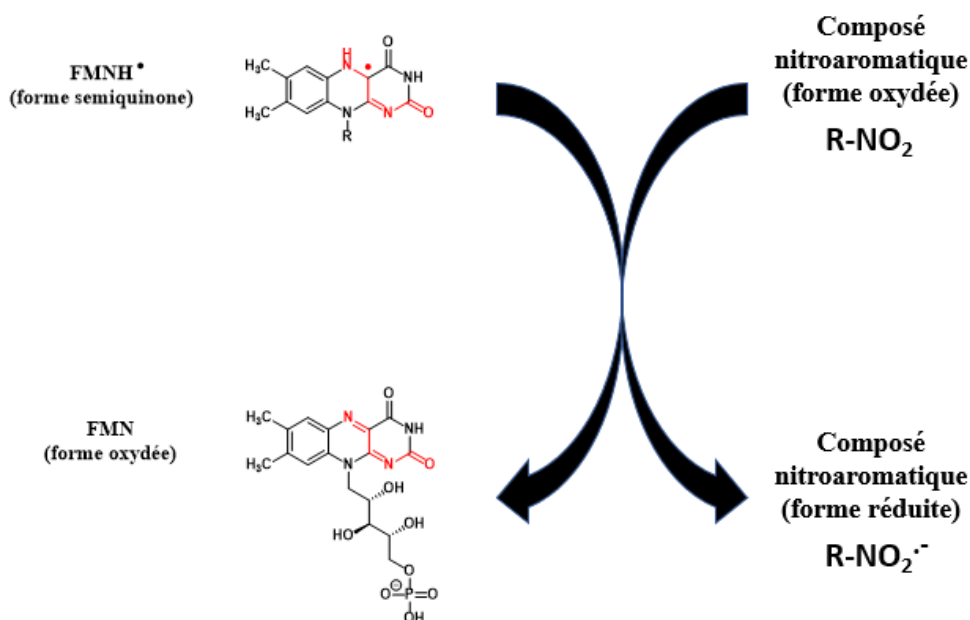
<sup>255</sup> M. D. Roldan, E. Pérez-Reinado, F. Castillo *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, 32, 474-500.

<sup>274</sup> P. R. Race, A. L. Lovering, R. M. Green *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 13256-13264.



### 3.2.2. Réduction à 1 électron, par les nitroréductase de type II.

Les nitroréductases de type II sont sensibles à l'oxygène ; elles vont catalyser la réduction à un électron du groupement  $\text{NO}_2$  et générer un radical anion  $\text{NO}_2^{\bullet-}$  qui va se réoxyder en présence d'oxygène moléculaire pour former des anion superoxydes  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .<sup>275</sup> Ces enzymes NAD(P)H dépendantes possèdent également la flavine FMN ou FAD en tant que cofacteur et vont catalyser la réduction du groupement  $\text{NO}_2$  selon un mécanisme bi-bi ping-pong similaire aux nitroréductases de type I. La principale différence est que ces nitroréductases de type II vont être capable de stabiliser la forme semiquinone ( $\text{FMNH}^{\bullet}$ ), une forme intermédiaire entre FMN et  $\text{FMNH}_2$ , qui va permettre la réduction à 1 seul électron du groupement nitroaromatique (Figure 47).<sup>276,277</sup> Dans des études sur une nitroréductase de *C. difficile*, il a été démontré que c'est une liaison hydrogène entre un résidu de glycine et l'azote 5 portant la charge négative qui stabilise cette forme semiquinone.<sup>278</sup>



**Figure 47 :** Schéma postulé de la réduction d'un groupement nitroaromatique par une nitroréductase de type II possédant NADH en tant que cofacteur.

Ce système enzymatique va donc catalyser la réduction à 1 électron d'un composé nitroaromatique et former un radical anion nitro. En milieu anaérobie, ce radical anion nitro pourrait également réagir avec un autre radical anion nitro, générant un intermédiaire nitroso et la molécule nitroaromatique de

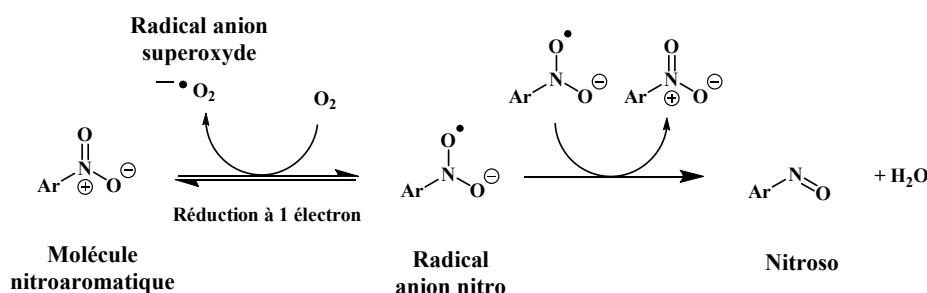
<sup>275</sup> R. P. Mason et J. L. Holtzman, *Biophys. Res. Commun.*, **1975**, 67, 1267-1274.

<sup>276</sup> R. L. Koder, C. A. Haynes, M. E. Rodgers *et al.*, *Biochemistry*, **2002**, 41, 14197-14205

<sup>277</sup> C. A. Haynes, R. L. Koders, A-F. Miller *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 11513-11520.

<sup>278</sup> W. W. Smith, R. M. Burnett, G. D. Darling *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1977**, 117, 195-225.

départ (Figure 48).<sup>272</sup> Ces nitroréductases ont été moins étudiées que les nitroréductases de type I car elles ont été moins nombreuses à être purifiées et caractérisées.



**Figure 48 :** Equation bilan de la bioactivation d'une molécule nitroaromatique par une NTR de type 2.

### 3.3. Des enzymes présentes chez les parasites responsables de la LV et de la THA.

Les composés nitroaromatiques sont des composés utilisés comme agents antibactériens depuis de nombreuses années. Ils sont connus pour agir en tant que prodrogues et nécessiter une bioactivation *via* des nitroréductases bactériennes pour exercer leur activité cytotoxique. Ces molécules sont également utilisées contre des maladies parasitaires comme la THA ou la maladie de Chagas. Si aucune molécule nitrée n'est actuellement sur le marché contre la leishmaniose viscérale, le fexinidazole (5-nitroimidazole) est en essais cliniques de phase IIb/III contre la THA et en essais cliniques de phase II contre la maladie de Chagas, tandis que le délamanide et PA-824, deux dérivés de 4-nitroimidazoles, ont montré un fort potentiel antileishmanien. Des recherches ont ainsi été menées pour découvrir le mécanisme d'action antiparasitaire de ces molécules. Deux nitroréductases ont alors été découvertes chez *Leishmania sp* et une chez *Trypanosoma sp*.

#### 3.3.1. NTR1, une nitroréductase de type I chez *Leishmania*

En 2013, une nitroréductase a été décrite chez *Leishmania donovani*<sup>279</sup>, parasite responsable de la leishmaniose viscérale. Cette nitroréductase possède des caractéristiques similaires à celles des nitroréductases bactériennes de type I avec une interaction non covalente avec FMN et NADH. Le rôle de cette nitroréductase mitochondriale dans l'activation de composés nitroaromatiques et l'importance de cet enzyme chez ce parasite ont alors été étudiés. Pour cette étude, le fexinidazole, un 5-nitroimidazole, a été utilisé. En effet, dans une étude précédente, cette molécule avait été testée sur des souches de *L. donovani* sur-exprimant une nitroréductase de *L. major* et son activité antileishmanienne avait été multipliée par 15.<sup>200</sup>

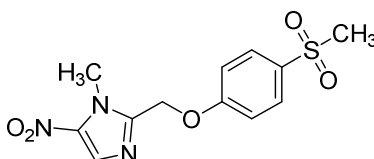
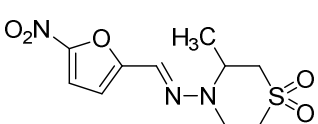
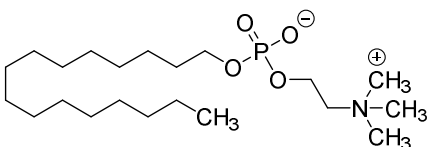
<sup>272</sup> F. J. Peterson, R. P. Mason, J. Hovsepian *et al.*, *J. Chem. Biol.*, **1979**, 254, 4009-4014.

<sup>279</sup> S. Wyllie, S. Patterson et A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 901-906.

<sup>200</sup> S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski *et al.*, *Sci. Trans. Med.*, **2012**, 4, 119re1.

L'incapacité à inactiver le gène de la nitroréductase chez *L. donovani* est une preuve du caractère essentiel de cet enzyme chez le parasite. Si pour l'heure, le rôle exact de ces NTRs chez le parasite n'est pas connu, son rôle dans l'activation de molécules possédant un groupement nitro ne fait pas de doute. D'autres études menées sur *Leishmania major* confirment l'importance de cette enzyme pour le parasite. Son activité est essentielle sur la forme promastigote, présente chez l'insecte, mais aussi sur la forme amastigote présente dans les macrophages de l'hôte.<sup>280</sup>

Plusieurs molécules aux propriétés antileishmaniennes ont été testées sur des souches de *L. donovani* qui, soit surexpriment le gène de la nitroréductase NTR1, soit qui ont un des deux allèles du gène de la NTR1 désactivé. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Molécule	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche sauvage (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche qui surexprime NTR1 (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche avec un allèle du gène NTR1 désactivé (μM).
<p>Fexinidazole sulfone</p> 	7,2	0,4	12,6
<p>Nifurtimox</p> 	5,0	0,32	7,23
<p>Miltéfosine</p> 	7,7	8,16	7,9

**Tableau 7 :** Activités de 3 molécules antileishmaniennes sur des souches de *L. donovani* respectivement sauvages, surexprimant la NTR1 ou avec un allèle du gène de la NTR1 supprimé.<sup>279</sup>

Dans ce tableau sont indiquées les concentrations inhibitrices médianes (CI<sub>50</sub>) sur différentes souches de *Leishmania donovani* de 3 molécules antileishmaniennes. La concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>) est la concentration à laquelle 50% des parasites sont tués, ainsi plus cette valeur est basse est plus l'activité antileishmanienne est forte. Lorsque l'on compare les CI<sub>50</sub> sur la souche sauvage

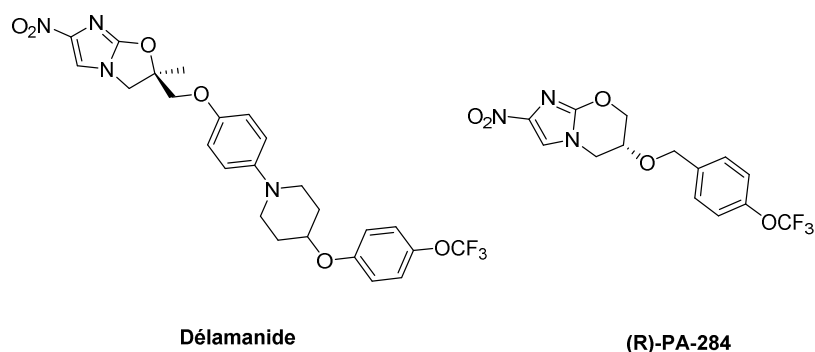
<sup>280</sup> A. A. Voak, V. Gobalakrishnapillai, K. Seifert *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 28466-28476.

<sup>279</sup> S. Wyllie, S. Patterson et A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 901-906.

et la souche qui surexprime NTR1, on peut constater que le fexinidazole sulfone (le métabolite du fexinidazole) et le nifurtimox ont des activités antileishmaniennes augmentées, respectivement d'un facteur 18 et 15. Au contraire, lorsqu'une version du gène de la NTR est supprimée, les  $CI_{50}$  de ces deux molécules sont plus élevées. Par ailleurs, la miltéfosine, qui ne contient pas de groupement nitro ne voit pas son activité varier significativement entre les différentes souches. Ces données confirment l'importance de NTR1 dans la bioactivation de molécules possédant un groupement  $NO_2$  aromatique.

### 3.3.2. NTR2, une nitroréductase de type 2 chez *Leishmania*.

Récemment, les propriétés antileishmaniennes de deux dérivés de 4-nitroimidazoles ont été décrites : le délamanide, une molécule anti-tuberculeuse, et (R)-PA-284, énantiomère S du PA-284, en essais cliniques de phase II contre la tuberculose (Figure 49).<sup>281,282</sup>



**Figure 49 :** Structure de deux composés nitroaromatiques bioactivés par la NTR2 de *Leishmania*.

Le mécanisme d'action de ces bicycles nitroaromatiques a été étudié, démontrant que ces deux molécules ne sont pas bioactivées par NTR1. Cependant, leurs analogues non nitrés étant inactifs, le rôle du groupement  $NO_2$  restait clé et laissait à penser qu'il existait une autre enzyme capable de bioactiver ces deux molécules. En 2016, NTR2 a ainsi été identifiée et caractérisée.<sup>283</sup> Cette nitroréductase est présente dans le cytosol du parasite à la différence de la NTR1 qui est mitochondriale. Elle utilise NADH ou NADPH en tant que donneur d'électrons et FMN en cofacteur non covalent. A la différence de NTR1, le remplacement des deux copies du gène de NTR2 n'a aucun effet sur le développement des parasites du stade promastigote démontrant qu'elle n'est pas essentielle mais a un effet significatif bien que peu important sur la capacité de division de la forme amastigote intramacrophagique, présente chez l'hôte.

<sup>281</sup> S. Patterson, S. Wyllie, S. Norval *et al.*, *eLife*, **2016**, 5, e09744.

<sup>282</sup> S. Patterson, S. Wyllie, L. Stojanovski *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 4699-4706.

<sup>283</sup> S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval *et al.*, *PLoS Pathog.*, **2016**, 12, e1005971.

A partir de ces premiers résultats, des travaux de protéomique, de génomique, et d'induction de résistances ont permis d'obtenir des souches de *L. donovani* promastigotes résistantes à PA-824, d'autres qui surexpriment NTR2 ou qui au contraire ont vu les deux versions du gène de la NTR2 supprimés. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous :

Molécule	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche sauvage (nM)	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche résistante à (R)-PA- 824 (nM)	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche qui surexprime NTR2 (nM)	CI <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigote, souche sans le gène NTR2 (nM).
Fexinidazole sulfone	8200	8900	4600	7880
Nifurtimox	1800	6020	122	6400
Délamanide	15,5	> 50.000	0,8	> 50.000
(R)-PA-824	93,6	> 100.000	8,7	> 100.000

**Tableau 8 :** Activités des 4 molécules antileishmaniennes sur des souches de *L. donovani* respectivement sauvages, résistantes à (R)-PA-824, surexprimant la NTR2 ou avec une version du gène de la NTR2 supprimé.<sup>283</sup>

Dans ce tableau, lorsque l'on compare les CI<sub>50</sub> des différentes molécules sur la souche sauvage avec les CI<sub>50</sub> sur la souche qui surexprime NTR2, on peut constater que les activités antileishmaniennes de (R)-PA-824, du délamanide et du nifurtimox sont améliorées respectivement de facteurs 11, 19 et 15. Au contraire, l'activité du fexinidazole est augmentée seulement d'un facteur 2, ce qui est jugé non significatif d'une bioactivation par cette NTR. Par ailleurs, la perte totale d'activité antileishmanienne sur une souche de *L. donovani* dont le gène de la NTR2 a été remplacé, pour le délamanide et (R)-PA-824, montre que ces deux molécules sont bioactivées sélectivement par la NTR2.

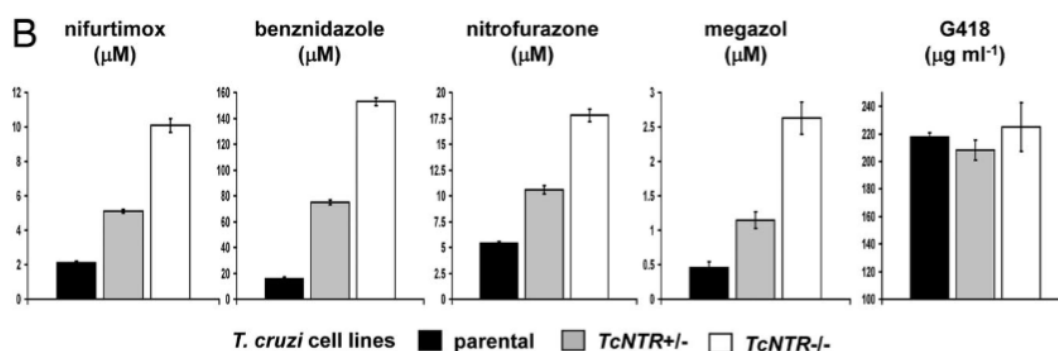
Le fexinidazole à quant à lui un niveau d'activité similaire sur la souche de *L. donovani* ne possédant plus la NTR2 à celle sur la souche sauvage, ce qui prouve une bioactivation sélective par NTR1. Le nifurtimox semble bioactivé par les deux NTR (NTR1 et NTR2) car si son potentiel antileishmanien était amélioré sur les parasites qui surexpriment la NTR2, lorsque cette nitroréductase n'est plus exprimée, il maintient un certain niveau d'activité. Les résultats sur les souches de parasites qui sont résistantes à (R)-PA-824 confirment ces résultats. Des études supplémentaires doivent maintenant être réalisées afin de déterminer les structures des métabolites à la suite d'une bioactivation par NTR2 et leurs rôles dans l'action leishmanicide.

<sup>283</sup> S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval *et al.*, *PLoS Pathog.*, **2016**, 12, e1005971.

### 3.3.3. NTR, une nitroréductase de type 1 chez *Trypanosoma*.

En 2008, des travaux ont démontré l'existence d'une nitroréductase de type I chez les trypanosomes (*T. cruzi* ou *T. brucei*), capable de bioactiver des composés nitroaromatiques.<sup>284</sup> A la suite du séquençage du génôme du trypanosome et par comparaison avec une séquence d'une NTR de type 1 de *E. Coli*, il a été découvert qu'à la fois *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei* possèdent un unique gène codant pour une NTR de type I. Comme les nitroréductases bactériennes, cette nitroréductase utilise NADH en tant que donneur d'électrons (aucune activité n'a été constatée avec NADPH) et FMN en tant que cofacteur. Ces nitroréductases sont essentielles aux trypanosomes, en effet si le gène n'a pas pu être supprimé chez *T. brucei*, chez *T. cruzi* sa suppression empêche les trypomastigotes de se différencier en trypomastigotes métacycliques, la forme infestante.

Des travaux ont alors été initiés afin de comprendre le rôle de ces NTR dans la bioactivation des composés nitroaromatiques aux propriétés trypanocides. Dans ces travaux, les médicaments de référence contre la maladie de Chagas, le nifurtimox et le benznidazole, ont été testés sur des souches de *T. cruzi* surexprimant cette NTR, ou au contraire ayant des niveaux moins élevés de NTR (Figure 50).



**Figure 50 :** Activités anti-*Trypanosoma* (CI<sub>50</sub> en µM) de composés nitroaromatiques de référence sur des souches de *T. Cruzi* sauvages exprimant la NTR (parental), ayant perdu un des deux allèles du gène de la NTR (TcNTR <sup>+/-</sup>) et ayant perdu les deux allèles du gène de la NTR (TcNTR<sup>-/-</sup>). G418 est le contrôle négatif.<sup>284</sup>

Ainsi pour les 4 molécules possédant un groupement NO<sub>2</sub>, l'activité antitrypanosomale est diminuée sur les souches qui ont perdu un ou deux allèles du gène codant pour la NTR, en comparaison avec celle sur une souche sauvage, ce qui est la preuve d'une bioactivation de ces molécules par la NTR de *Trypanosoma*. Par ailleurs, en mettant en contact une souche de *T. Cruzi* avec une dose quotidienne de nifurtimox, ils ont observé une résistance croisée au benznidazole, ce qui est inquiétant d'un point de vue clinique lorsque l'on sait que les traitements au benznidazole et nifurtimox durent plusieurs mois.

<sup>284</sup> S. R. Wilkinson, M. C. Taylor, D. Horn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 5022-5027.

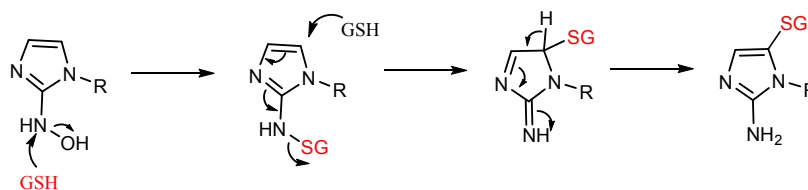
### 3.4. Mécanisme d'action antiparasitaire à la suite d'une bioactivation par une NTR.

Il est désormais établi que le mécanisme d'action antiparasitaire des molécules qui possèdent un groupement nitro aromatique passe par une bioactivation *via* des nitroréductases parasitaires. Ces NTR vont sélectivement métaboliser ces molécules en dérivés toxiques pour les parasites, du fait de l'absence de ces enzymes dans les cellules de mammifères. Cependant les métabolites ne sont pas toujours identifiés et leurs effets sur l'ADN, l'ARN ou autres macromolécules biologiques n'est pas toujours renseigné.

#### 3.4.1. Mécanisme d'action antiparasitaire *via* une bioactivation par NTR1.

Lorsqu'un composé nitroaromatique est bioactivé par une nitroréductase de type I, les métabolites principalement formés *via* des réductions à deux électrons seraient les intermédiaires nitroso, hydroxylamine et finalement amine. Or si ces intermédiaires n'ont pas encore été isolés après une mise en contact avec des parasites du genre *Leishmania* ou *Trypanosoma*, leur potentiel cytotoxique est connu depuis de nombreuses années.

Dans la littérature, il est décrit que le dérivé nitroso est très rapidement converti en hydroxylamine une fois généré en raison d'une seconde réduction à deux électrons, plus rapide que la première.<sup>255</sup> L'intermédiaire hydroxylamine est électrophile et sera capable d'interagir avec des macromolécules nucléophiles pour provoquer des dommages cellulaires. Il est très réactif et capable de réagir rapidement avec des macromolécules possédant par exemple des fonctions thiols.<sup>285</sup> Ainsi, il a été mis en évidence que des dérivés de 2-hydroxyaminoimidazole forment des adduits covalents avec le glutathion (GSH) comme représenté dans la figure 51.<sup>286</sup> Ce tripeptide possède un groupement thiol, nucléophile, qui va pouvoir réagir avec le groupement hydroxylamine, électrophile, et former un intermédiaire instable. Ce composé hydroxylamine est également capable de réagir avec d'autres protéines, et plus particulièrement avec le groupement thiol des cystéines, formant des liaisons covalentes.<sup>287</sup>



**Figure 51** : Mécanisme proposé pour la formation d'adduits entre un 2-hydroxyaminoimidazole et le glutathion.

Par ailleurs, une étude sur des 5-nitroimidazoles, représentés par le métronidazole a été réalisée. Il a été mis en évidence que le dérivé hydroxylamine est capable de former un adduit avec le groupement

<sup>255</sup> M. D. Roldan, E. Pérez-Reinado, F. Castillo *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, 32, 474-500.

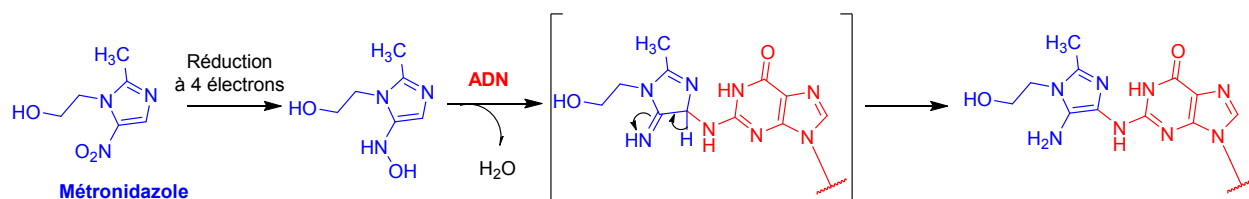
<sup>285</sup> D. Leitsch, D. Kolarich, I. B. Wilson *et al.*, *PLoS Biol.*, **2007**, 5, e211.

<sup>286</sup> G. F. Whitmore et A. J. Varghese, *Biochem. Pharmacol.*, **1986**, 35, 97-103.

<sup>287</sup> J. A. Raleigh et C. J. Koch, *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, 40, 2457-2464.



amine en position 2 des guanines de l'ADN mais aussi avec le groupement thiol des cystéines (Figure 52).<sup>288</sup>



**Figure 52 :** Mécanisme proposé pour la formation d'adduits entre une guanine de l'ADN et le métronidazole.

Les composés nitroaromatiques, *via* une bioactivation sélective par les nitroréductases parasitaires, pourraient ainsi former des adduits covalents avec des macromolécules comme l'ADN ou des protéines et mener à la mort du parasite.

### 3.4.2. Mécanisme d'action antiparasitaire *via* une bioactivation de NTR2.

Lorsqu'un composé nitroaromatique est bioactivé par une nitroréductase parasitaire de type II, les métabolites formés responsables de l'activité antiparasitaire seraient le radical anion nitro et le radical anion superoxyde qui fait partie des espèces réactive de l'oxygène (ROS).<sup>289</sup> Lorsque les capacités antioxydantes des cellules médiées par différentes enzymes sont dépassées, le niveau d'espèces réactives de l'oxygène va augmenter et le phénomène de stress oxydant apparaît. Ces espèces radicalaires sont connues pour réagir avec les macromolécules présentes dans les cellules et provoquer des dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides :<sup>255,290</sup>

- L'oxydation de l'ADN provoque des lésions incluant des bases azotées oxydées, des sites abasiques (des sites où la base purine ou pyrimidine est manquante) ou encore des cassures d'ADN mono-brin ou double-brin. La guanine est la base la plus susceptible de subir une oxydation en raison d'un potentiel d'oxydation faible.<sup>291</sup> Bien qu'il existe plusieurs mécanismes de réparation à la suite de dégâts causés par l'oxydation de l'ADN, une grande concentration d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) vont surpasser les capacités de réparation de la cellule, induire des mutations et provoquer son apoptose.
- Le stress oxydant peut aussi être responsable de dommages au niveau des membranes cellulaires et plus particulièrement au niveau des lipides de ces membranes. Les lipides sont transformés en une forme peroxydée capable de modifier l'ADN ou les protéines de la cellule.

<sup>288</sup> G. L. Kedderis, L. S. Argenbright et G. T. Miwa, *Chem. Res. Toxicol.*, **1989**, 2, 146-149.

<sup>289</sup> F. J. Peterson, R. P. Mason, J. Hovsepian *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 4009-4014.

<sup>255</sup> M. D. Roldan, E. Pérez-Reinado, F. Castillo *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, 32, 474-500.

<sup>290</sup> D. G. Deavall, E. A. Martin, J. M. Horner *et al.*, *J. Toxicol.*, **2012**, 2012, 645460.

<sup>291</sup> W. L. Neeley et J. M. Essigmann, *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, 19, 491-505.

Cette peroxydation peut aussi être responsable de changements au niveau de la fluidité de la membrane ou inactiver des enzymes ou des récepteurs membranaires.<sup>292</sup>

- Enfin ces radicaux peuvent également provoquer des dégâts d'oxydation au niveau des protéines et des enzymes présents dans la cellule. Cette oxydation protéique peut avoir un impact important et agir sur des fonctions vitales de la cellule comme la signalisation cellulaire, la structure cellulaire ou le métabolisme cellulaire. Certaines protéines sont plus sensibles que d'autres, notamment celles qui contiennent des cystéines, à l'oxydation.<sup>293</sup>

### **3.5. Les composés nitroaromatiques, des molécules mutagènes ?**

#### **3.5.1. Contexte**

Si des composés nitrohétérocycliques sont aujourd'hui en essais cliniques comme le fexinidazole, la présence d'un groupement NO<sub>2</sub> sur un candidat médicament a longtemps eu mauvaise presse. Les industries pharmaceutiques avaient ainsi retiré ces composés présumés toxiques de leurs collections de criblage afin notamment de réduire le risque d'échec lors du processus de développement d'un médicament potentiel. En cause, des molécules aux propriétés hépatotoxiques, mais surtout mutagènes et carcinogènes. Les différents tests d'évaluation de la mutagenicité et de la génotoxicité ainsi que leur pertinence par rapport aux composés nitrés seront abordés dans la suite de ce chapitre.

L'introduction de molécules nitrohétérocycliques tels que les nitroimidazoles ou les nitrofuranes en thérapeutique a ouvert de nouvelles perspectives notamment dans le traitement des maladies parasitaires comme la maladie de Chagas ou des maladies bactériennes. Le mécanisme d'action de ces molécules implique une bioactivation qui va les transformer en dérivés capables de former des liaisons covalentes avec l'ADN et les protéines cellulaires. Ils ont ainsi pendant longtemps été suspecté d'être mutagènes et génotoxiques et des molécules comme les nitroarènes, les nitrofluorènes, ou les nitropyrènes ont été décrits comme des agents mutagènes (Figure 53).<sup>294,295,296</sup> Il existe aujourd'hui plusieurs tests pour évaluer *in vitro* ou *in vivo* ces propriétés : le test d'Ames est réalisé uniquement *in vitro* tandis que le test des comètes et le test du micro-noyau peuvent être réalisés à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces tests donnent des informations différentes mais complémentaires sur le pouvoir mutagène et génotoxique d'une molécule. Si le test d'Ames est le plus couramment utilisé, sa pertinence est remise en question pour l'évaluation de molécules possédant un groupement NO<sub>2</sub>.<sup>297</sup>

<sup>292</sup> S. V. Avery, *Biochem. J.*, **2011**, 434, 201-210.

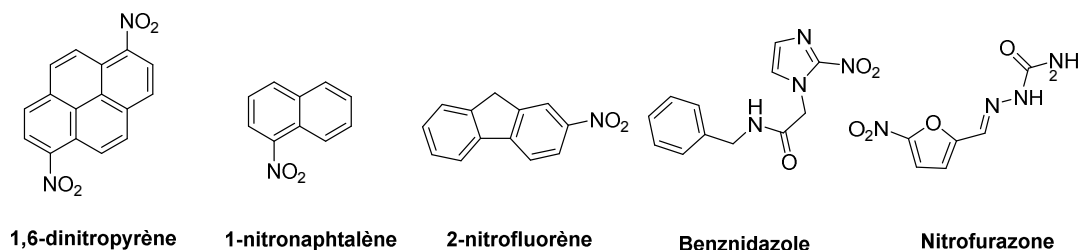
<sup>293</sup> S. Bandyopadhyay et R. M. Gronostajski, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 29949-29955.

<sup>294</sup> R. Padda, C. Wang, J. Hughes *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2003**, 22, 2293-2297.

<sup>295</sup> D. Traversi, R. Degan, R. De Marco *et al.*, *Environ. Int.*, **2009**, 35, 905-910.

<sup>296</sup> P. Kovacic et R. Somanathan, *J. Appl. Toxicol.*, **2014**, 34, 810-824.

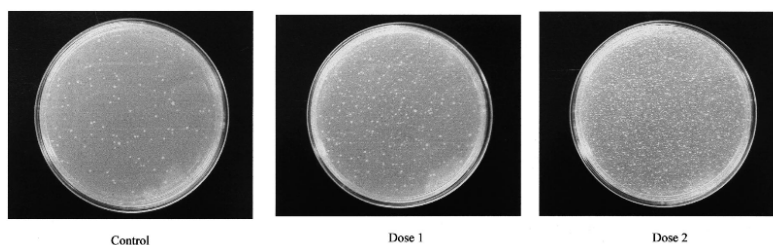
<sup>297</sup> A. Buschini, L. Ferrarini, S. Franzoni *et al.*, *J. Parasitol. Res.*, **2009**, DOI : 10.1155/2009/463575.



**Figure 53 :** Structures de molécules nitroaromatiques possédant des propriétés mutagènes incluant le benznidazole, un médicament sur le marché contre la maladie de Chagas.

### 3.5.2. Le test d'Ames.

Le test d'Ames est un test de mutagenicité développé par le Dr Bruce Ames dans les années 1970.<sup>298</sup> C'est un test rapide à réaliser qui va permettre d'évaluer le pouvoir de substances chimiques à provoquer des dommages génétiques *via* l'induction de mutations. Ce test utilise des souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* génétiquement modifiées pour ne pas synthétiser de l'histidine (His<sup>-</sup>), un acide aminé essentiel à leur croissance et à la formation de colonies. Ces bactéries auxotrophes (His<sup>-</sup>) redeviennent prototrophes (His<sup>+</sup>) à une fréquence très faible, c'est-à-dire que peu d'entre elles vont subir des mutations spontanées leur permettant de synthétiser à nouveau de l'histidine et donc de survivre dans un milieu ne contenant pas cet acide aminé. Le principe de ce test est donc une mise en contact de ces bactéries avec une substance chimique avant d'observer si cette substance a induit des mutations leur permettant de se développer dans un milieu pauvre en histidine, on parle de révertants, en comparaison avec des bactéries qui n'ont pas été mises en contact avec ces mêmes substances. Ce test est désormais la référence mondiale pour déterminer le potentiel mutagène de toute nouvelle molécule ou tout nouveau candidat médicament. *Salmonella typhimurium* n'étant pas capable de métaboliser les composés testés, le Dr Bruce Ames a ainsi proposé d'incorporer dans le test un mélange appelé S9-mix qui contient des microsomes hépatiques incluant des cytochromes P450 et autres enzymes de métabolisation. Cette solution va permettre de métaboliser les molécules testées et de déterminer si le potentiel mutagène provient de la substance initiale, de ses métabolites ou des deux.



**Figure 54 :** Exemple de test d'Ames sur une souche TA100 de *Salmonella typhimurium* pour l'azoture de sodium. Dose 1 : 2,5 µg/boîte et dose 2 : 5 µg/boîte, le contrôle contient seulement du DMSO.<sup>299</sup>

<sup>298</sup> B. N. Ames, W. E. Durston et E. Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, 70, 2281-2285.

<sup>299</sup> K. Mortelmans et E. Zeiger, *Mut. Res.*, **2000**, 455, 29-60.

Un protocole classique du test d'Ames consiste en l'ajout de bactéries auxotrophes à l'histidine (environ  $10^8$ ) à une solution de la molécule testée seule ou avec du S9-Mix. A ce mélange sont ajoutés de l'agar-agar contenant quelques traces d'histidine pour permettre aux bactéries de survivre. Ce mélange final est ajouté à des boîtes de Pétri contenant de l'agar solidifié puis les boîtes sont mises à l'étuve à 37°C pendant 48 h. À la suite de ce temps d'incubation, le nombre de colonies qui ont mutés et se sont développées dans un milieu pauvre en histidine sont comptées. Sur la figure 54, la comparaison de la dose 1 avec le contrôle négatif permet de conclure que l'azoture de sodium induit des mutations. Un composé est considéré comme mutagène lorsqu'il augmente d'un facteur 2 le nombre de bactéries ayant subi des mutations en comparaison avec le contrôle négatif. De plus, en comparant la dose 2 et la dose 1, l'induction de ces mutations semble dose-dépendante.

Il existe de très nombreuses souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes à l'histidine sur lesquelles ce test peut être réalisé, elles possèdent des mutations supplémentaires qui augmentent leur sensibilité aux substances mutagènes. Les principales mutations sont :

- La mutation *rfa* va modifier la structure de la membrane externe *via* un défaut en lipopolysaccharides de la bactérie facilitant l'entrée de molécules aux masses moléculaires élevés.<sup>300</sup>
- La mutation *uvrB* va bloquer le processus de réparation des lésions sur l'ADN par excision et va donc augmenter la sensibilité de ces souches.<sup>287</sup>
- L'introduction d'un plasmide pKM101 va accroître la sensibilité aux substances mutagènes en augmentant le processus de réparation de l'ADN sujets aux erreurs, favorisant la mutagénèse induite.<sup>301,302</sup>

Les souches de *S. typhimurium* les plus utilisées sont TA97, TA98, TA100 et TA102.<sup>303</sup> Les souches TA97, TA98 et TA100 possèdent une mutation *rfa* et *uvrB* et ne diffèrent que par la position de la mutation sur le gène responsable de la biosynthèse d'histidine indiquant ainsi où a lieu la mutation après incubation avec une substance mutagène.<sup>295</sup> TA97 et TA98 permettront de détecter des mutations provoquant des décalages du cadre de lecture de l'ARN à cause de l'insertion ou la suppression de base tandis que TA100 permettra de détecter des mutations provoquées par des substitutions de base.<sup>304</sup> La souche TA102 contient un gène *uvrB* fonctionnel, elle est capable de détecter les dégâts oxydants provoqués par différents types de molécules comme des peroxydes ou des aldéhydes.<sup>305</sup>

<sup>300</sup> B. N. Ames, F. D. Lee et W. E. Durston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**, 70, 782-786.

<sup>287</sup> J. A. Raleigh et C. J. Koch, *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, 40, 2457-2464.

<sup>301</sup> B. N. Ames, J. McCann et E. Yamasaki, *Mutat. Res.*, **1975**, 31, 347-364.

<sup>302</sup> D. E. Levin, E. Yamasaki et B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **1982**, 94, 315-330.

<sup>303</sup> I. Marques de Oliveira, D. Bonatto et J. A. Pegas Henriques, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, **2010**, 2, 1008-1019.

<sup>304</sup> S. Tejs, *Environ. Biotechnol.*, **2008**, 4, 7-14.

<sup>305</sup> D. E. Levin, M. Hollstein, M. F. Christman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 7445-7449.

Les avantages de ce test sont nombreux. Il est assez rapide, simple à réaliser, peu coûteux, sensible, et il apporte une réponse quantitative. Tous ces avantages en font le test de mutagénicité le plus courant et le plus utilisé à travers le monde. Cependant, ce test est réalisé sur des souches bactériennes et donc n'est pas totalement représentatif de ce qui se passe chez la cellule eucaryote. De plus, *Salmonella typhimurium* est une bactérie et possède des nitroréductases.<sup>306,307</sup> Le potentiel mutagène des composés nitroaromatiques déterminé par le test d'Ames pourrait donc être remis en question car ces nitroréductases vont bioactiver ces molécules en des dérivés toxiques qui induisent des mutations chez les bactéries. Des équipes ont ainsi démontré que des tests d'Ames réalisés sur des souches dont le gène codant pour la nitroréductase a été éteint, supprime le potentiel mutagène des composés possédant un groupement NO<sub>2</sub>.<sup>308,309</sup> D'autres tests sont donc nécessaires pour évaluer le potentiel mutagène et génotoxique des molécules nitroaromatiques.

### **3.5.3. Le test des comètes.**

Le test des comètes est un test de génotoxicité électrophorétique qui a été mis au point dans les années 1980 par Ostling and Johanson, pour détecter les dommages sur l'ADN induits par des radiations.<sup>310</sup>

Depuis, des améliorations ont été apportées afin d'en faire un test rapide qui permet de détecter un large éventail de dégâts causés sur l'ADN comme les cassures simple-brin ou les sites alcali-labiles par un agent génotoxique, ce qui en fait la méthode d'évaluation de la génotoxicité la plus utilisée à ce jour.<sup>311</sup> Au contraire du test d'Ames, le test des comètes peut être réalisé sur tout type de cellules eucaryotes.

Après un temps d'incubation variable des cellules eucaryotes avec une concentration donnée de la molécule testée, choisie afin de limiter au maximum sa cytotoxicité, les cellules sont décollées avec de la trypsine et immobilisées dans un gel d'agarose puis déposées sur des lames de microscopes.<sup>312</sup> Une fois que le gel a durci, les lames sont trempées dans un bain de lyse contenant des tensioactifs comme le Triton afin de rompre les membranes cellulaires et libérer les noyaux.<sup>313</sup> Les lames sont ensuite trempées dans un tampon d'électrophorèse et traitées avec une solution de NaCl concentrée et un pH > 13 dans le but de dénaturer l'ADN. Finalement, un champ électrique (électrophorèse) est appliqué et l'ADN chargé négativement migre vers la cathode.<sup>314</sup> L'ADN va migrer sous forme de sphère si la molécule n'a pas d'effets génotoxiques. Si au contraire l'ADN a été endommagé, les fragments d'ADN vont se détacher lors de la migration et former un halo qui aura la forme d'une comète. C'est cette migration caractéristique qui a donné son nom au test (Figure 55).

<sup>306</sup> K. Tatsumi, T. Doi, H. Yoshimura *et al.*, *J. Pharmacobiodyn.*, **1982**, 5, 423-429.

<sup>307</sup> Y. Yanto, M. Hall et A. S. Bommarius, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 1826-1832.

<sup>308</sup> W. T. Speck, J. L. Blumer, E. J. Rosenkranz *et al.*, *Cancer Res.*, **1981**, 41, 2305-2307.

<sup>309</sup> E. J. Rosenkranz, E. C. McCoy, R. Mermelstein *et al.*, *Carcinogenesis*, **1982**, 3, 121-123.

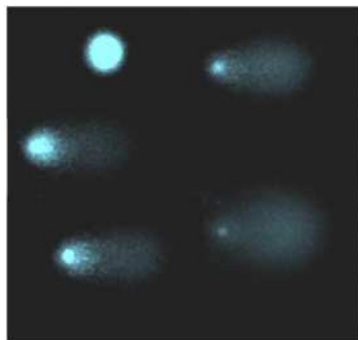
<sup>310</sup> O. Ostling et K. Johanson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 123, 291-298.

<sup>311</sup> N. Singh, M. McCoy, R. Tice *et al.*, *Exp. Cell. Res.*, **1988**, 175, 184-191.

<sup>312</sup> R. Araldi, T. Melo, N. Diniz *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 2013, 1-7.

<sup>313</sup> A. Azqueta et A. Collins, *Arch. Toxicol.*, **2013**, 87, 949-968.

<sup>314</sup> A. R. Collins, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840, 794-800.



**Figure 55 :** Images typiques d'un test des comètes réalisé sur des lymphocytes en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En haut à gauche l'ADN non endommagé, en bas à droite l'ADN le plus endommagé. Les comètes ont été colorées au DAPI, un marqueur fluorescent de l'adénine et de la thymine.<sup>315</sup>

Une fois l'électrophorèse réalisée, la lame de microscope contenant les cellules et neutralisée, fixée, colorée au bromure d'éthidium (un marqueur des acides nucléiques) puis observée au microscope optique ou à fluorescence. Les données sont finalement analysées *via* un logiciel où, pour chaque noyau, on compare l'intensité de fluorescence de la tête et celle de la comète pour quantifier les dommages sur l'ADN. Récemment des nouvelles méthodes ont été décrites pour des criblages à haut débit. Quelques  $\mu$ L du mélange cellule-agarose placés sur un support ou un film Gelbond® suffisent, les mini-gels durcissent immédiatement, raccourcissant les temps de manipulations.<sup>316,317</sup>

Le test des comètes est désormais un test simple, rapide, peu coûteux, adapté au criblage à haut débit de molécules, qui requiert très peu de matériel et qui permet de détecter différents types de dommages causés par des agents génotoxiques. De plus, au contraire des bactéries utilisées lors du test d'Ames, les cellules eucaryotes ne possédant pas de nitroréductases. Le test des comètes est une méthode efficace pour juger du potentiel génotoxique des composés nitroaromatiques sans l'effet des métabolites toxiques générés par leur bioactivation par des nitroréductases.

### 3.5.4. Le test du micro-noyau.

Le micro-noyau a été décrit pour la première fois dans des érythrocytes dans les années 1950 par Howell et Jolly qui lui ont donné le nom de corps de Howell et Jolly. Ces micro-noyaux correspondent à des petits fragments d'ADN qui apparaissent dans le cytoplasme des cellules en interphase lorsqu'un chromosome ou un fragment de chromosome n'est pas incorporé dans un noyau-fille à la suite d'une division cellulaire.<sup>318</sup> Ils peuvent se former soit par cassure chromosomique (effet clastogène) soit par un dérèglement du processus de la mitose menant à une modification du nombre de chromosomes (effet

<sup>315</sup> K. Mortelmans et E. Zeiger, *Mut. Res.*, **2000**, 455, 29-60.

<sup>316</sup> K. B. Gutzkow, T. M. Langleite, S. Meier *et al.*, *Mutagenesis*, **2013**, 28, 333-340.

<sup>317</sup> H. Perdry, K. B. Gutzkow, M. Chevalier *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **2018**, DOI : 10.1002/em.22204.

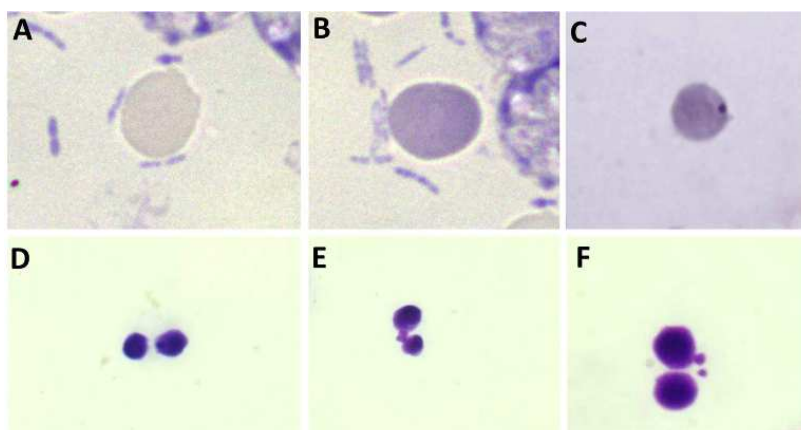
<sup>318</sup> G. Krishna et M. Hayashi, *Mutat. Res.*, **2000**, 455, 155-166.



aneugène). Ainsi des molécules aux propriétés clastogènes ou aneugènes peuvent provoquer l'apparition de ces micro-noyaux qui est alors synonyme de génotoxicité, transmise à la descendance.<sup>319</sup>

A l'instar du test des comètes, le test du micro-noyau peut être réalisé sur une large gamme de cellules eucaryotes mais le plus commun utilise des érythrocytes de rongeurs.<sup>320</sup> Les cellules sont mises en contact avec les molécules testées pendant un temps donné puis de la cytochalasine B est ajoutée. Cette molécule bloque la division cellulaire et plus particulièrement la cytotéièrese qui est la division d'une cellule mère en deux cellules filles qui a lieu pendant la télophase.<sup>321</sup> Les cellules sont alors recueillies puis colorées afin d'être analysées par microscopie. Les données sont alors analysées et le nombre de cellules possédant un micro-noyaux sont comptées et comparées à des contrôles négatifs et positifs pour déterminer si une substance provoque des dommages au niveau des chromosomes (Figure 56).

Ce test possède quelques avantages en comparaison du test des comètes : il ne considère que les dommages génétiques provoqués sur des cellules mitotiques et permet l'analyse de 1000 cellules (100 pour le test des comètes).<sup>322</sup> Par ailleurs, la meilleure solution pour établir le profil de génotoxicité d'une nouvelle substance est l'association du test des comètes et du test du micro-noyau, ces deux tests étant complémentaires et apportant des informations différentes.



**Figure 56 :** Résultats obtenus à la suite d'un test du micro-noyau *in vivo* (à un grossissement de x1000) : A) érythrocyte normochromatique ; B) érythrocyte polychromatique ; C) érythrocyte polychromatique avec un micro-noyau. Images de lymphocytes binuclées après traitement à la cytochalasine B : D) Sans dommages sur les chromosomes ; E) Présence d'un pont chromosomique ; F) Présence de 2 micro-noyaux.<sup>312</sup>

<sup>319</sup> S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi *et al.*, *Carcinogenesis*, **2007**, 28, 625-631.

<sup>320</sup> T. Morita, J. T. McGregor et M. Hayashi, *Mutagenesis*, **2011**, 26, 223-230.

<sup>321</sup> M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema *et al.*, *Mutat. Res.*, **2003**, 540, 153-163.

<sup>322</sup> B. Miller et F. Potter-locher, *Mutat. Res.*, **1998**, 410, 81-116.

<sup>312</sup> R. Araldi, T. Melo, N. Diniz *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 2013, 1-7.



Afin d'illustrer l'importance de combiner plusieurs tests de génotoxicité a été donné avec 3 composés nitroaromatiques : le nifurtimox, le benznidazole et le métronidazole.<sup>297</sup> Un premier test d'Ames a été réalisé sur ces trois composés et a été positif pour chacun d'entre eux. Si pour le nifurtimox et le benznidazole une forte augmentation du nombre de colonies a été observé même aux plus faibles doses, le métronidazole n'a engendré des mutations chez les bactéries qu'à des fortes doses. Les premières conclusions sont donc que ces trois dérivés sont mutagènes. Cependant, ces bactéries possèdent des nitroréductases et ce sont probablement les métabolites qui induisent les mutations chez ces bactéries. Un test des comètes a alors été réalisé sur ces trois molécules et si pour le métronidazole il a été négatif même pour des doses 10 fois supérieures aux concentrations plasmatiques chez les patients traités avec ce médicament, il a été positif pour le benznidazole et le nifurtimox. Enfin le test du micro-noyau a donné les mêmes résultats : positif pour le benznidazole et le nifurtimox, négatif pour le métronidazole. Ces résultats démontrent bien que le test d'Ames n'est pas le plus adapté pour tester la mutagénicité des composés nitroaromatiques à cause de la bioactivation par les nitroréductases bactériennes, au contraire du test des comètes et du test des micronoyaux qui utilisent des cellules eucaryotes, dépourvues de nitroréductases.

### **3.6. Les nitroréductases parasitaires en chimie thérapeutique.**

Les nitroréductases sont des enzymes présentes chez différents types de bactéries et de protozoaires tout en étant absentes des cellules de mammifère, des substrats de ces enzymes permettent donc de cibler sélectivement ces agents infectieux. Cependant, en vue de développer des substrats de nitroréductases de *Leishmania* ou de *Trypanosoma*, une meilleure connaissance de ces cibles est encore nécessaire. En effet, à ce jour il n'y a aucune structure cristallographique d'une nitroréductase parasitaire, ce qui est une grande limitation dans la conception rationnelle d'une molécule antikinétoplastidé, empêchant notamment une approche de modélisation moléculaire comme le docking.

Par ailleurs, un autre moyen existe afin de remonter à la structure tridimensionnelle d'une protéine : l'alignement de séquences d'acides aminés. L'objectif principal est d'étudier le pourcentage d'homologie de deux séquences en acides aminés correspondant à deux protéines dont la structure 3D de l'une d'entre elles est connue. En cas de pourcentage de similarité élevé il serait en effet possible de remonter à la structure tridimensionnelle de la protéine dont on souhaite connaître la structure par analogie *via* une approche de modélisation moléculaire. Ce modèle théorique permettrait alors de faire du docking, une méthode qui faciliterait l'identification de substrats de cette protéine.

Ainsi, les séquences en acides aminés de nitroréductases parasitaires ont pu être rapportées suite à des études génomiques dont celles des nitroréductases de *Leishmania* (NTR1 et NTR2) et celle de

---

<sup>297</sup> A. Buschini, L. Ferrarini, S. Franzoni *et al.*, *J. Parasitol. Res.*, **2009**, 2009, DOI: 10.1155/2009/463575.

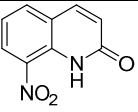


#### 4. Découverte d'un nouveau hit antileishmanien en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones en 2012.

##### 4.1. Etude du pharmacophore

Notre équipe de recherche s'intéresse depuis des années à la synthèse de nouveaux hétérocycles aux propriétés antiparasitaires et plus particulièrement antileishmaniennes. Un travail préliminaire porté sur la synthèse et l'évaluation antiparasitaire de ces quinoléines substituées en position 2 a par la suite mené à la découverte d'un nouveau hit antileishmanien, la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.<sup>323</sup>

En effet, avec une concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) de 6,6 µM sur la forme promastigote de *L. donovani*, cette molécule est aussi active que la pentamidine (6,0 µM) et seulement deux fois moins active que la miltéfosine (3,1 µM), le seul médicament administrable par voie orale contre la leishmaniose viscérale. Son profil cytotoxique est également intéressant avec une concentration cytotoxique 50% (CC<sub>50</sub>, soit la concentration de la molécule testée qui tue 50% des cellules par rapport à un témoin) sur J774 et HepG2 de respectivement 105 µM et 126 µM en comparaison avec celui de la miltéfosine (respectivement de 50 µM et 95 µM). Des études réalisées sur ce pharmacophore ont permis d'en conclure que le groupement lactame en position 2 est indispensable à l'activité antileishmanienne. La présence du groupement NO<sub>2</sub> en position 8 est également indispensable à l'activité antileishmanienne, la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one et la 5-nitroquinoléin-2(1H)-one étant inactifs.

	CI <sub>50</sub> (µM) <i>L. dono.</i> promastigote	CI <sub>50</sub> (µM) <i>L. dono.</i> amastigote intraM.	CC <sub>50</sub> (µM) HepG2 hépatocytes	CC <sub>50</sub> (µM) J774 macrophages	IS CC <sub>50</sub> HepG2 / CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> ama. intraM
 <b>8-nitroquinoléin-2(1H)-one</b>	6,6	6,5	126,3	105	19
<b>Miltéfosine</b>	3,1	6,8	50,3	94,6	7,5
<b>Amphotéricine B</b>	0,1	0,2	8,8	3,1	44

**Tableau 9 :** Activités biologiques de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one et de deux molécules de références contre la leishmaniose viscérale.

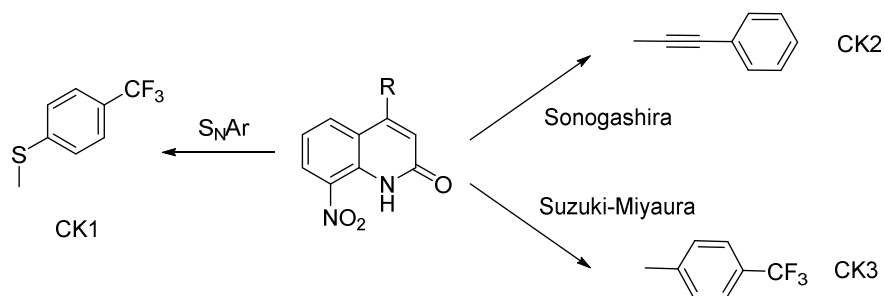
##### 4.2. Pharmacomodulation antileishmanienne en position 4 du noyau.

À la suite de l'identification d'un nouveau hit antileishmanien, de nouvelles études de relations structure-activité en position 4 de ce noyau ont été réalisées.<sup>324,325</sup> Pour cela, plusieurs séries de molécules ont été synthétisées *via* des réactions de S<sub>N</sub>Ar et des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira puis évaluées *in vitro* sur les formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania donovani*. Plusieurs nouvelles molécules aux propriétés antileishmaniennes ont ainsi été découvertes (Figure 58).

<sup>323</sup> L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 54, 75-86.

<sup>324</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 92, 282-294.

<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.



**Figure 58 :** Structure des meilleures molécules issues d'une série de 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-ones substituées en position 4.

Les activités biologiques sont présentées dans le tableau 10 et comparées avec celles de deux molécules de référence : l'amphotéricine B et la miltéfosine. Dans cette série, CK1 possède la meilleure activité antileishmanienne avec une  $CI_{50}$  de 3,8  $\mu M$ . Cependant, et comme de nombreuses autres molécules de cette série, CK1 est peu soluble en milieu biologique ce qui empêche la détermination de sa cytotoxicité et de son activité sur la forme amastigote. Par ailleurs, la molécule CK2 est active sur la forme promastigote de *L. donovani* mais est également cytotoxique, ce qui limite son intérêt. Enfin, CK3 présente une activité intéressante de 6,1  $\mu M$  sur la forme promastigote de *L. donovani* mais est inactive sur la forme amastigote.

	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <i>L. dono.</i> promastigote	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <i>L. dono.</i> amastigote intraM.	$CC_{50}$ ( $\mu M$ ) HepG2	IS $CC_{50}$ HepG2 / $CI_{50}$ <i>L.</i> <i>dono. ama.</i> intraM
CK1	3,8	> 12,5	> 12,5	> 1
CK2	2,7	-	11,6	-
CK3	6,1	> 20	42,7	> 2,1
<b>Hit antileishmanien</b>	<b>6,6</b>	<b>6,5</b>	<b>126,3</b>	<b>19</b>
Miltéfosine	3,1	6,8	50,3	7,5
Amphotéricine B	0,1	0,2	8,8	44

**Tableau 10 :** Activités biologiques des meilleurs dérivés de 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-ones substitués en position 4.

Ces études n'ont donc pas permis de découvrir un nouveau hit antileishmanien plus intéressant que la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one. Ainsi, de nouveaux travaux de synthèse organique sont apparus comme nécessaires pour explorer le potentiel antiparasitaire de ce pharmacophore nitroaromatique.

#### 4.3.Définition d'un hit et d'un lead anti-*Trypanosomatidae*.

Réduire l'impact des maladies d'origine infectieuse qui affectent principalement des personnes dans les pays en voie de développement demande des efforts de collaboration entre les différents acteurs de la recherche en thérapeutique. Ainsi, des experts de TB Alliance, de Drugs for Neglected Diseases

*initiative* et de Medecines for Malaria Venture ont collaboré et mis en place des critères spécifiques à chaque maladie pour définir ce qu'est un « hit » et ce qu'est un « lead » (Figure 59).<sup>326,327</sup>

En infectiologie, un « hit » ou une « touche » est une molécule aux propriétés anti-infectieuses découverte dans le cadre d'une campagne de criblage sur un pathogène donné. Une fois un « hit » identifié, des travaux de chimie médicinale sont initiés avec pour but d'améliorer le profil biologique *via* des études de relations structure-activité, notamment pour en faire un « lead », ou molécule « tête de série ».

Un hit anti-infectieux est défini comme une molécule qui possède des critères de plusieurs types:

- Des critères chimiques incluant une synthèse simple avec de bons rendements, une structure aisément modifiable en vue de futures études RSA et une pureté du produit supérieure à 90%
- Des critères biologiques comprenant une  $CI_{50}$  sur l'agent pathogène suffisamment basse pour pouvoir être développé en lead par la suite ( $CI_{50} < 10 \mu M$ )
- Un index de sélectivité par rapport à une ligne humaine supérieur à 10 ( $CC_{50}$  lignée humaine /  $CI_{50}$  pathogène)
- Une activité sur des souches résistantes
- Des critères pharmacocinétiques avec une stabilité métabolique évaluée sur 2 types d'organismes.

Un lead anti-infectieux est obtenu après une phase d'optimisation du hit, son évaluation requiert des tests *in vivo*. Les critères qui définissent un lead sont biologiques comprenant :

- Une baisse significative de la parasitémie *in vivo*.
- Un index de sélectivité supérieur à 100
- L'évaluation physicochimique et pharmacocinétique. En effet, un bon lead doit être soluble en milieu aqueux, être stable en présence de microsomes, ne pas se fixer en proportion trop importante aux protéines plasmatiques sauf s'il crée une liaison covalente avec sa cible, ne pas inhiber les cytochromes P450 ou le canal hERG, ne pas être mutagène et/ou génotoxique et ne montrer aucune toxicité lors des tests *in vivo*. Tous ces tests sont primordiaux afin d'évaluer le potentiel de ce lead à devenir un candidat médicament qui rentrerait alors en essais pré-cliniques.

<sup>326</sup> S. Nwaka, B. Ramirez, R. Brun *et al.*, *Plos. Negl. Dis.* **2009**, 3, e440

<sup>327</sup> K. Katsuno, J. N. Burrows, K. Duncan *et al.*, *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2015**, 14, 751-758

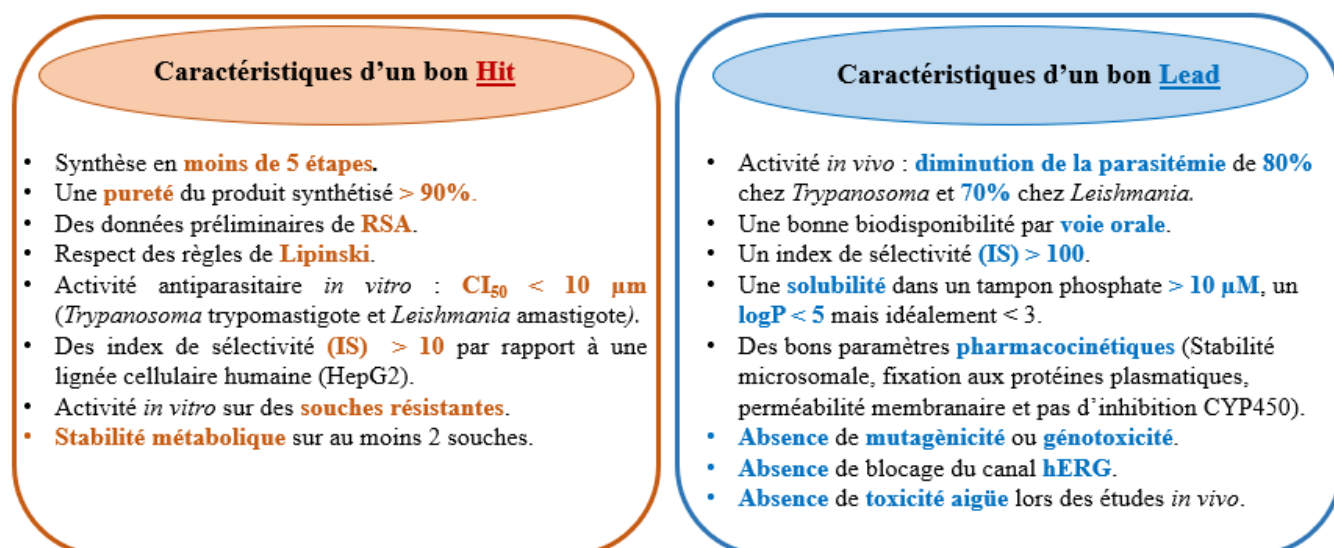


Figure 59 : Etudes de RSA et évaluation du potentiel antikinétoplastidés de molécules en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

## 5. Objectifs de thèse.

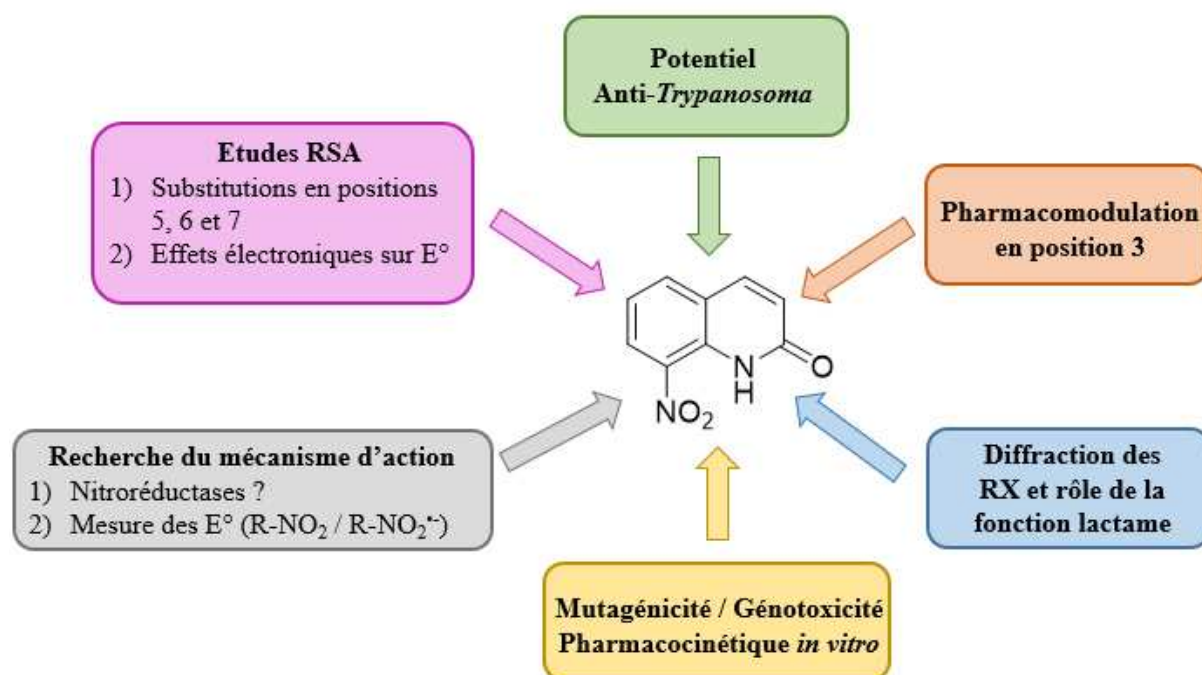


Figure 60 : Etudes des RSA et évaluation du potentiel antikinétoplastidés de molécules en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

A la suite des résultats présentés précédemment, de nombreux paramètres restent à étudier en vue de mieux comprendre ce pharmacophore antileishmanien (Figure 60). Si les études de pharmacomodulation en position 4 n'ont pas permis de découvrir de nouveaux dérivés intéressants, des études de pharmacomodulation en position 3 sont à réaliser afin de continuer à explorer les relations

structure-activité de ce noyau. Des études de RSA sur la partie benzénique, *via* la substitution du pharmacophore en positions 5, 6 et 7, sont également à effectuer et notamment pour mesurer l'effet de ces modifications sur les potentiels de réduction de ces molécules qui sont susceptibles d'être bioactivées par des nitroréductases. Le rôle de la fonction lactame dans l'activité antiparasitaire est toujours inconnu, une analyse par diffraction aux rayons X d'une molécule en série 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one pourrait nous donner des informations structurales aidant à sa compréhension. Par ailleurs, si ces molécules sont actives contre *Leishmania donovani* et *infantum*, il serait intéressant de les évaluer sur un autre parasite de la famille des *Trypanosomatidae* comme *Trypanosoma*. La recherche du mécanisme d'action des molécules de cette série est également à effectuer *via* la mesure des potentiels de réduction des nouvelles molécules synthétisées ou encore *via* l'évaluation biologique sur des souches de parasites qui surexpriment les nitroréductases. Finalement, des tests de mutagénicité et de génotoxicité, tout comme l'évaluation pharmacocinétique permettrait de déterminer le potentiel thérapeutique des molécules de cette série.

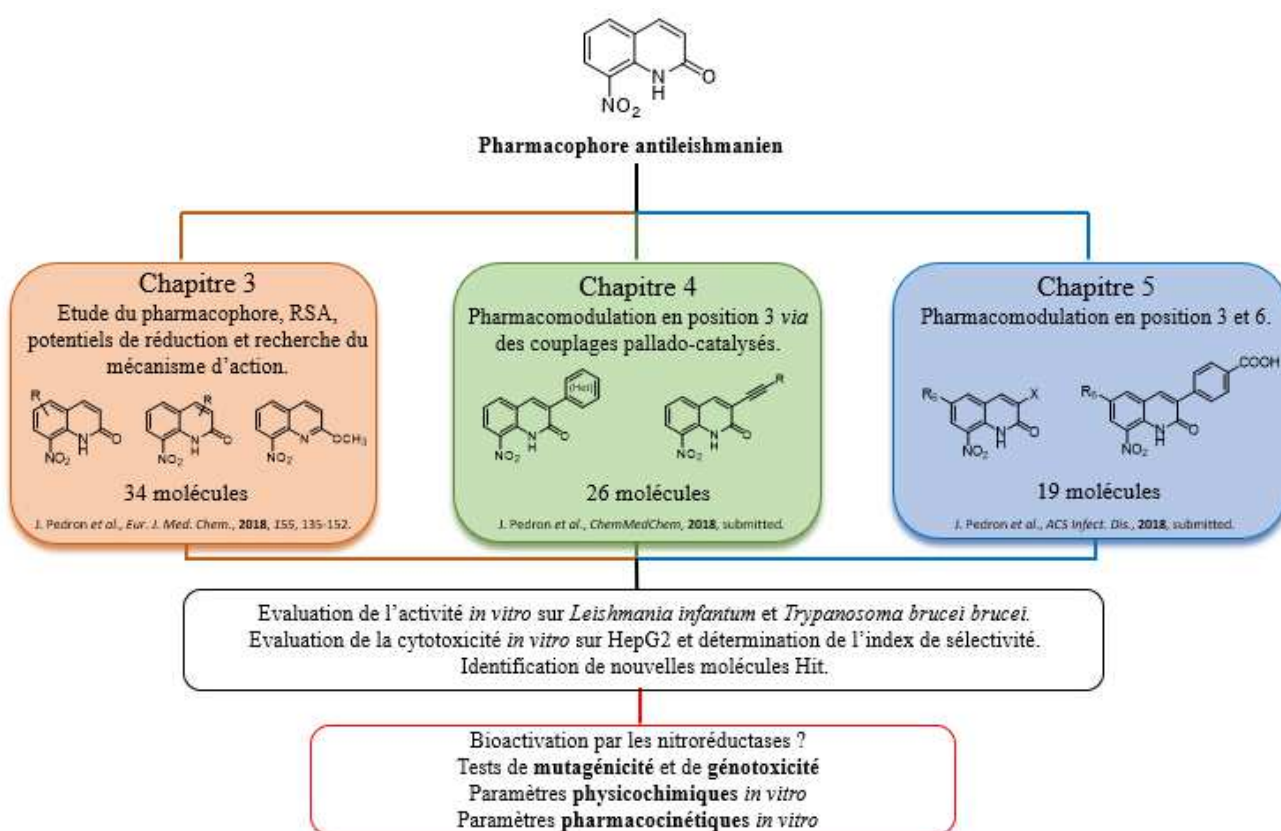
Pour cela, le travail de pharmacochimie accompli lors de cette thèse sera divisé en trois chapitres (Figure 61) :

- 1) Le chapitre 3 de cette thèse est consacré à l'étude du pharmacophore. Une approche rationnelle alliant l'étude des relations structure-activité et la mesure des potentiels de réductions de nouveaux dérivés en série 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one a ainsi été choisie. Pour cela, 35 molécules ont été synthétisées. L'introduction de substituants sur la partie pyridone du pharmacophore a été réalisée depuis la 2-chloroquinoléine tandis que la substitution de la partie benzénique a nécessité l'emploi d'une nouvelle voie de synthèse utilisant des nitroanilines pour substrats. Afin d'étudier le rôle de la fonction lactame, des dérivés *O*-méthylés ont été préparés. Pour chacune de ces molécules, le potentiel de réduction a été mesuré par voltampérométrie cyclique avec pour but d'observer l'effet électronique de la modification de ce pharmacophore et notamment de la fonction lactame. Enfin des premières études mécanistiques ont été réalisées *via* des évaluations biologiques sur des souches qui surexpriment les nitroréductases de ces parasites.
- 2) Le chapitre 4 sera quant à lui focalisé sur la pharmacomodulation en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one. Pour cela, 26 nouveaux dérivés ont été synthétisés *via* des réactions de couplage pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira permettant l'introduction d'un (hétéro)cycle aromatique ou d'un substituant alcynyle. De plus, une analyse électrochimique sur quelques dérivés a été effectuée afin d'étudier l'effet de l'introduction de ces substituants sur les potentiels de réduction et les activités antiparasitaires.



- 3) Le chapitre 5 abordera enfin les travaux de pharmacomodulation en position 3 et 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one *via* l'introduction de groupements électroattracteurs comme le CF<sub>3</sub> ou des atomes d'halogènes. Une série de 19 nouvelles molécules a été synthétisée avec un groupement électroattracteur en position 6 et un atome d'halogène ou un groupement *para*-carboxyphényl en position 3. Enfin l'analyse électrochimique de ces nouveaux dérivés a été réalisée afin d'étudier l'effet de l'introduction de ces groupements électroattracteurs sur les potentiels de réduction et sur les propriétés antiparasitaires. Ce travail souligne le rôle de la substitution des positions 3 et 6 du pharmacophore sur l'activité antileishmanienne mais surtout sur l'activité anti-*Trypanosoma*.

L'évaluation d'activité biologique a été effectuée pour chacune des molécules synthétisées à la fois sur *Leishmania infantum* et sur *Trypanosoma brucei brucei* tout comme l'évaluation de la cytotoxicité sur une lignée humaine HepG2 permettant l'identification de nouvelles molécules « tête de série ». Chacune de ces nouvelles molécules « tête de série » a été évaluée plus précisément *via* des tests de mutagénicité ou de génotoxicité, la détermination de leurs paramètres physicochimiques (test PAMPA) et pharmacocinétiques (stabilité microsomale et fixation aux protéines plasmatiques) tout comme des tests sur des souches qui surexpriment les nitroréductases des différents parasites.



**Figure 61 :** Plan général des travaux de pharmacochimie réalisés en série 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-ones

## CHAPITRE 3

Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-Kinétoplastidés.



## Chapitre 3 : Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-Kinétoplastidés.

### 1. Introduction

Sur la base des travaux précédemment réalisés au laboratoire, un travail de synthèse organique a été effectué en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one, guidé par 5 objectifs principaux (Figure 59) :

- Poursuivre l'étude du pharmacophore *via* l'établissement de relations structure-activité visant à améliorer l'hydrosolubilité des molécules de cette série et à augmenter leur activité antileishmanienne.
- Etudier les potentiels de réduction de ces nitrohétérocycles et rechercher un éventuel lien entre ces potentiels et leur activité biologique.
- Rechercher le mécanisme d'action des molécules de cette série.
- Déterminer leur activité anti-*Trypanosoma* pour mieux définir leur spectre antiparasitaire.
- Evaluer leur génotoxicité pour statuer sur leur potentiel pharmaceutique.

En termes de synthèse organique, afin d'étudier les relations structure-activité de la partie pyridone du pharmacophore, de nombreuses molécules ont été synthétisées à partir de 2-chloroquinoléines. Cette stratégie étant difficilement applicable si l'on souhaite introduire des groupements sur la partie nitrobenzénique du pharmacophore, nous avons donc choisi de suivre une seconde voie de synthèse utilisant des nitroanilines comme substrats et former le noyau nitroquinoléin-2(1H)-one *via* une réaction de cyclocondensation. Enfin en vue d'explorer le rôle de la fonction lactame, de nouveaux dérivés *O*-méthylés ou possédant une fonction amide extra-cyclique en position *alpha* du groupement nitro ont également été préparés.

Au total, 35 molécules ont été synthétisées dont 14 sont originales et 9 sont des intermédiaires réactionnels. La re-synthèse de 13 molécules précédemment décrites a été nécessaire pour mesurer leurs potentiels de réductions et pour évaluer leur activité antiparasitaire sur de nouveaux parasites : *Leishmania infantum* et *Trypanosoma brucei brucei*.

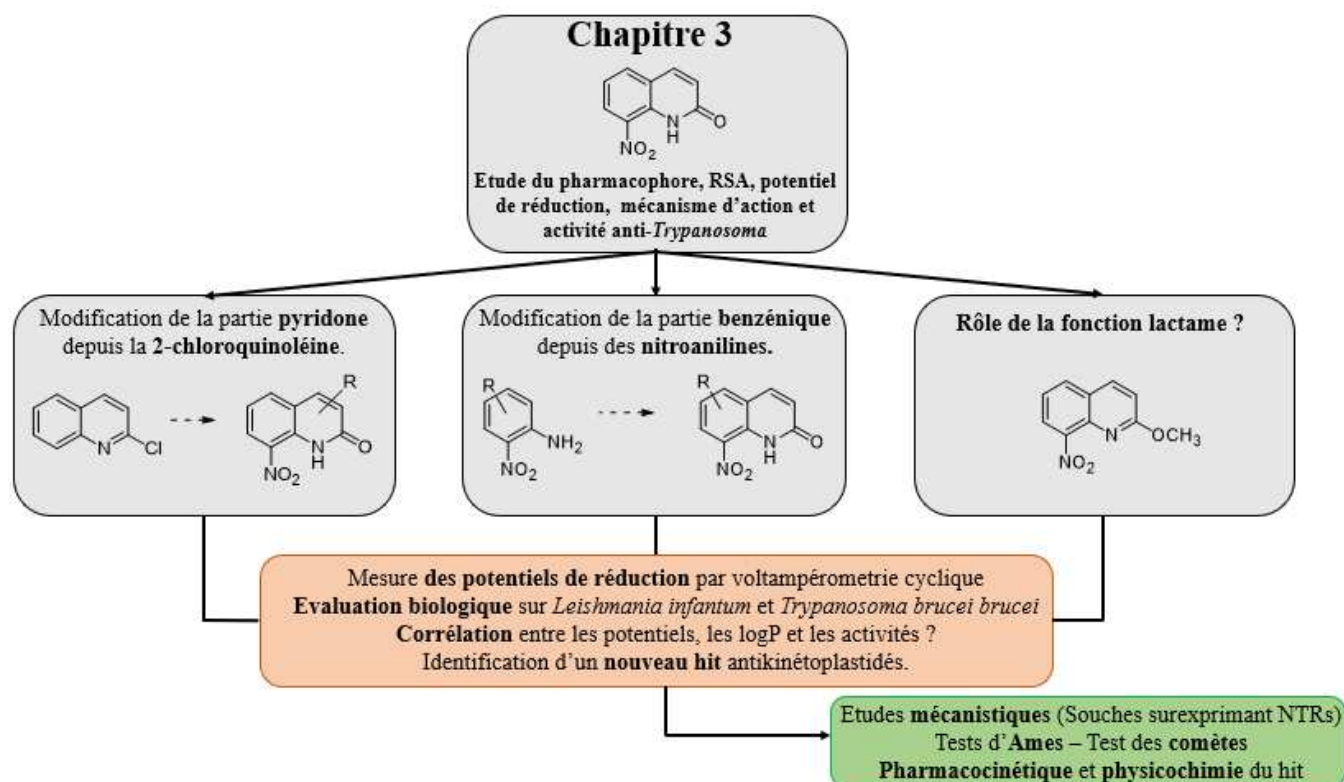


Figure 62 : Résumé des objectifs pharmacochimiques du chapitre 3.

## 2. Travaux de synthèse hétérocyclique.

### 2.1. Etude du pharmacophore antiparasitaire.

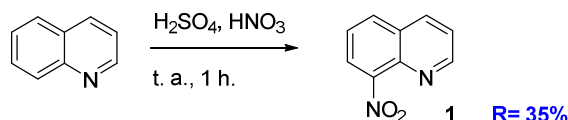
Notre objectif est tout d'abord d'étudier le pharmacophore, et notamment l'importance de l'interaction entre le motif lactame et le groupement nitro en série 8-nitroquinoléin-2-(1H)-one. Pour cela, nous avons synthétisé un dérivé ne présentant pas cette fonction lactame, tout comme des analogues possédant une fonction amide extra-cyclique en position *alpha* du groupement NO<sub>2</sub>, en série benzénique ou quinoléine. La 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one a également été préparée en vue d'étudier l'effet de l'introduction d'un hétéroatome électronégatif supplémentaire dans la structure vis-à-vis du potentiel de réduction et de l'activité antiparasitaire.

#### 2.1.1. Synthèse d'un analogue dépourvu de fonction lactame : 8-nitroquinoléine.

Pour accéder à la 8-nitroquinoléine **1**, la nitration de la quinoléine a été réalisée à température ambiante dans un mélange sulfonitrique selon un protocole déjà décrit.<sup>328</sup> La nitration de la quinoléine

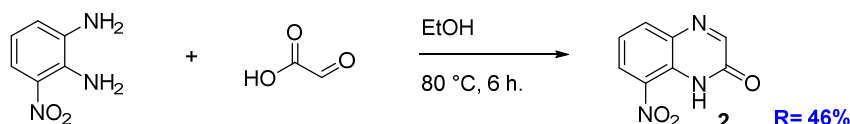
<sup>328</sup> F. Misani et M. T. Bogert, *J. Org. Chem.*, **1945**, 10, 458-463.

a permis d'obtenir deux isomères de position, la 8-nitroquinoléine et la 5-nitroquinoléine, cette dernière n'ayant pas été isolée. Le composé **1** a été obtenu avec un rendement de 35%.



### 2.1.2. Introduction d'un nouvel hétéroatome dans la structure : synthèse de la 8-nitroquinoxalin-2(1*H*)-one.

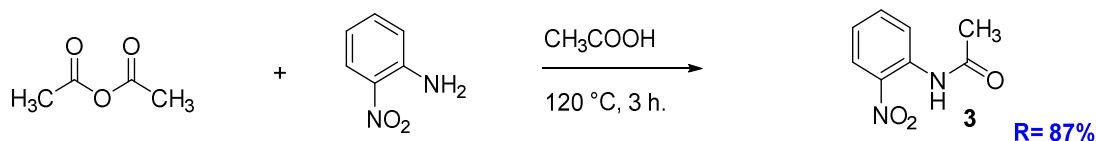
Pour obtenir la 8-nitroquinoxalin-2(1*H*)-one **2**, il n'est pas possible de procéder à la réaction de nitration de la quinoxalin-2(1*H*)-one, les travaux de Shahin<sup>329</sup> indiquant que cette réaction conduit exclusivement au produit nitré en position 6. Sur la base de ces mêmes travaux, nous avons alors décidé d'engager un substrat commercial nitré, la 3-nitro-1,2-phénylènediamine, dans une réaction de cyclocondensation avec l'acide glyoxylique et avons obtenu la molécule **2** avec un rendement de 46%.



### 2.1.3. Synthèse d'analogues à fonction amide extra-cyclique.

#### 2.1.3.1. Préparation du *N*-(2-nitrophényl)-acétamide.

Le *N*-(2-nitrophényl)-acétamide **3** a été synthétisé par réaction de la 2-nitroaniline avec de l'anhydride acétique en présence d'un excès d'acide acétique selon un protocole déjà décrit dans la littérature.<sup>330</sup> Ce composé a été obtenu avec un rendement de 87%.



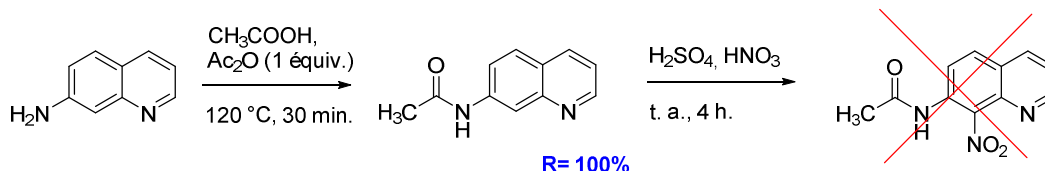
#### 2.1.3.2. Synthèse de la 7-acétylamino-8-nitroquinoléine.

Pour préparer la 7-acétylamino-8-nitroquinoléine en deux étapes depuis la 7-aminoquinoléine, deux stratégies ont été envisagées :

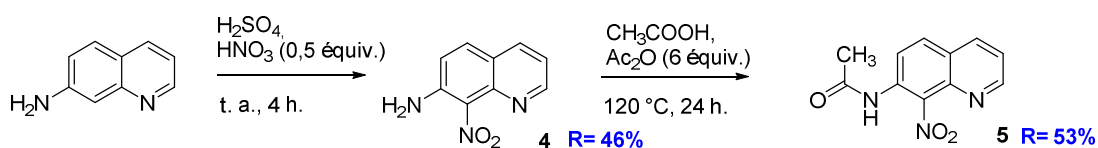
<sup>329</sup> M. I. Shahin, D. A. Abou El Ella, N. S. M. Ismail *et al.*, *Bioorg. Chem.* **2014**, 56, 16-26.

<sup>330</sup> V. V. Patil et G. S. Skankarling, *J. Org. Chem.*, **2015**, 80, 7876-7883.

- 1) L'acétylation la 7-aminoquinoléine a été réalisée selon un protocole classique utilisant de l'anhydride acétique dans de l'acide acétique à reflux. La 7-acétylaminoquinoléine a été obtenue avec un rendement quantitatif. Cependant, la nitration en milieu sulfonitrique de cet intermédiaire avec 0,5 équivalent d'acide nitrique a formé très majoritairement un produit di-nitré, non isolé, identifié en RMN du proton à partir du brut réactionnel.



- 2) Lors d'une séquence réactionnelle inversée, une première étape de nitration en présence d'un défaut d'acide nitrique a permis d'obtenir un mélange de produit di-nitré (non isolé) et de 7-amino-8-nitroquinoléine, isolée avec un rendement de 46%. Cette dernière a ensuite été acétylée avec un rendement de 53%.



## 2.2. Pharmacomodulation antikinétoplastidés en position 4 du noyau 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

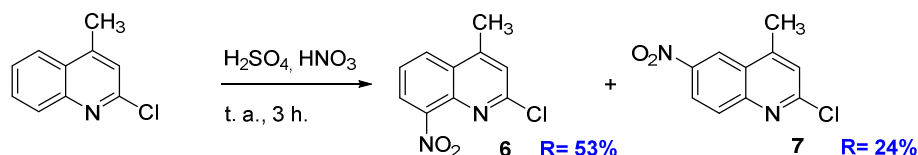
En vue de poursuivre les études de pharmacomodulation antileishmanienne effectuées en position 4 du pharmacophore, nous avons choisi de synthétiser des analogues de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one possédant un groupement méthyle en position 4. Ce groupement méthyle sera notamment utile dans le but d'introduire divers groupements hydrophiles, capables de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau et ainsi améliorer la solubilité en milieu aqueux de cette série, comparativement aux dérivés synthétisés en 2015.<sup>324,325</sup>

<sup>324</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 92, 282-294.

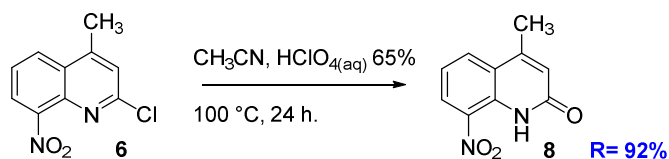
<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.

### 2.2.1. Préparation de la 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Afin d'obtenir la 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one, la 2-chloro-4-méthylquinoléine a été engagée dans une réaction de nitration dans le mélange sulfonitrique, selon un protocole déjà décrit par O. Johnson.<sup>331</sup> Cette réaction a conduit à la formation de deux isomères de position, la 2-chloro-4-méthyl-8-nitroquinoléine **6** et la 2-chloro-4-méthyl-6-nitroquinoléine **7**, cette première étant majoritaire et isolée avec un rendement de 53%.



Le lactame **8** a ensuite été synthétisé à partir de la 2-chloro-4-méthyl-8-nitroquinoléine **6** selon un protocole proposé par Andreev.<sup>332</sup> Le motif chloroimine du dérivé **6** a ainsi été converti en motif lactame par réaction avec un mélange 50/50 d'une solution aqueuse d'acide perchlorique à 60% et d'acétonitrile au reflux pendant 24 h. La 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **8** a ainsi été obtenue avec un rendement de 92%.



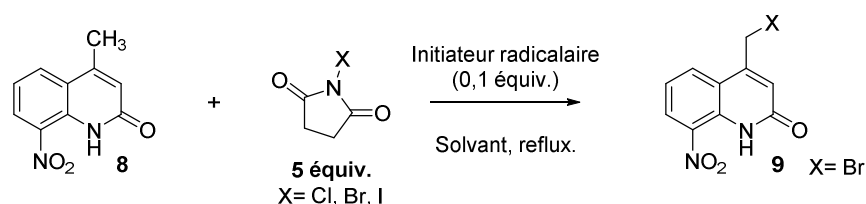
### 2.2.2. Synthèse de la 4-hydroxyméthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Dans une première étape, l'halogénéation le groupement méthyle de la molécule **8**, en vue d'introduire par la suite différents groupements par réactions de  $\text{S}_\text{N}2$ , s'est avérée difficile, malgré la réalisation de différents essais visant à améliorer le rendement. Nous avons ainsi étudié les différents paramètres de cette halogénéation radicalaire en jouant sur la nature du solvant, la nature de l'initiateur radicalaire, et la nature de l'agent d'halogénéation (tableau 11).

<sup>331</sup> O. H. Johnson et C. S. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 2867-2869.

<sup>332</sup> V. Andreev et Y. P. Nizhnik, *Russian J. Org. Chem.* **2002**, 38, 137-138.



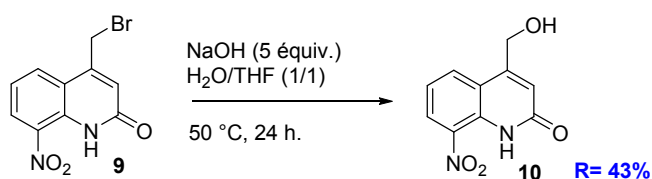


Initiateur Radicalaire	Solvant	X	Rendement
AIBN	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Br	Pas de conversion
AIBN	CHCl <sub>3</sub>	Br	Pas de conversion
AIBN	CCl <sub>4</sub>	Br	21%
Peroxyde de benzoyle	CCl <sub>4</sub>	Br	Pas de conversion
AIBN	CCl <sub>4</sub>	Cl	Nombreux produits
AIBN	CCl <sub>4</sub>	I	Pas de conversion

**Tableau 11** : Essais d'halogénéation radicalaire de la 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Cette mise au point nous amène à conclure que la formation de la molécule **9** est lente (48 h) et difficile, avec un rendement final de seulement 21%. Les seules conditions qui permettent de l'obtenir font appel à de l'azobisisobutyronitrile (AIBN) en tant qu'initiateur radicalaire, au tétrachlorure de carbone en tant que solvant (CCl<sub>4</sub>) et au *N*-bromosuccinimide (NBS) en tant qu'agent d'halogénéation, des conditions proches de celles utilisées dans la littérature par Majumdar en série 1,4-diméthylquinoléin-2(1H)-one.<sup>333</sup>

Dans une seconde étape, la 4-bromométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **9** a été engagée dans une réaction de S<sub>N</sub>2 par réaction avec de la soude dans un milieu eau-THF, en chauffant à 50°C pendant 24 h. L'alcool **10** a ainsi été obtenu avec un rendement de 43%.



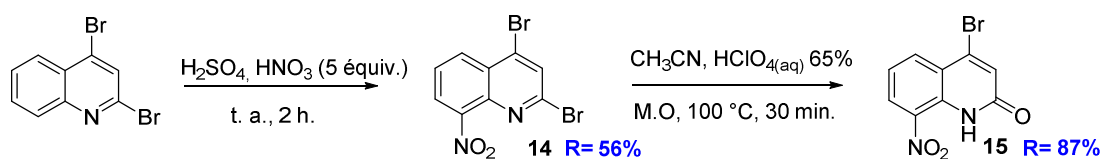
### 2.2.3. Introduction d'une chaîne de type 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine.

Afin d'introduire une chaîne fortement polaire en position 4 du pharmacophore, nous avons choisi la 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine, une diamine à motif polyéthylèneglycol. Nous avons réalisé une monoprotection de cette diamine afin d'éviter la formation de dimère lors de la réaction avec le dérivé bromométhylé **9**. Pour cela, la 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine a été mise à réagir avec 0,2 équiv. de dicarbonate de di-tert-butyle (Boc<sub>2</sub>O) dans du chloroforme pendant 24 h, selon un protocole décrit par Cinelli.<sup>334</sup> En effet, Boc<sub>2</sub>O doit être le réactif limitant afin d'éviter la formation de produit diprotégé dont

<sup>333</sup> K. C. Majumdar et N. Kundu, *Synth. Commun.* **2006**, 36, 1879-1886.

<sup>334</sup> M. A. Cinelli, B. Cordero, T. S. Dexheimer *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7145-7155.





## 2.3. Préparation de molécules antikinétoplastidés depuis la 2-chloroquinoléine.

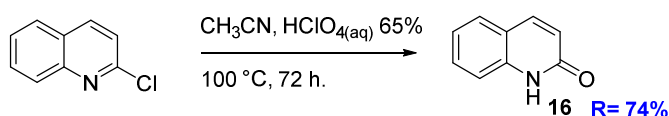
En vue de modifier la partie pyridone du pharmacophore, nous avons choisi de synthétiser différents dérivés depuis un seul substrat, la 2-chloroquinoléine. Pour cela, différentes réactions ont été réalisées incluant des réactions de nitrations, des transformations du motif chloroimine en lactame, des *O*- ou *N*-méthylations, des halogénations sélectives en position 3 du pharmacophore ou encore des réductions du groupement  $\text{NO}_2$ .

### 2.3.1. Fonctionnalisation de la 2-chloroquinoléine.

#### 2.3.1.1. Synthèse de dérivés de la quinoléin-2(1H)-one.

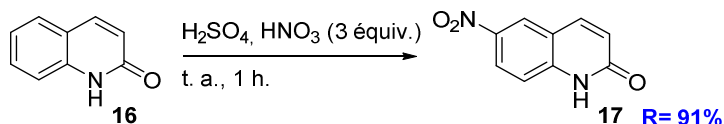
##### 2.3.1.1.1. Préparation de la quinoléin-2(1H)-one.

Afin d'obtenir la quinoléin-2(1H)-one **16**, le motif chloroimine de la 2-chloroquinoléine a été transformé en lactame par réaction avec une solution aqueuse d'acide perchlorique selon le protocole décrit par Andreev.<sup>324</sup> La molécule **16** a ainsi été synthétisée avec un rendement de 74%.



##### 2.3.1.1.2. Nitration de la quinoléin-2(1H)-one.

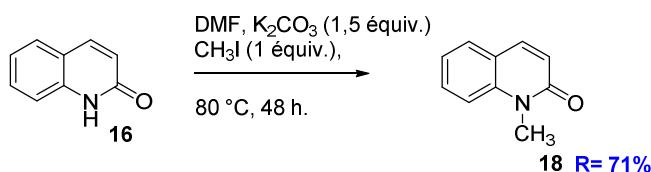
La molécule **16** a par la suite été engagée dans une réaction de nitration utilisant le mélange sulfonitrique. Comme décrit dans la littérature, la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one est formée avec un bon rendement (ici 91%).<sup>335</sup>



<sup>335</sup> A. Van Oeveren, M. Motamedi, E. Martinborough *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 1527-1531.

### 2.3.1.1.3. Méthylation de la quinoléin-2(1H)-one.

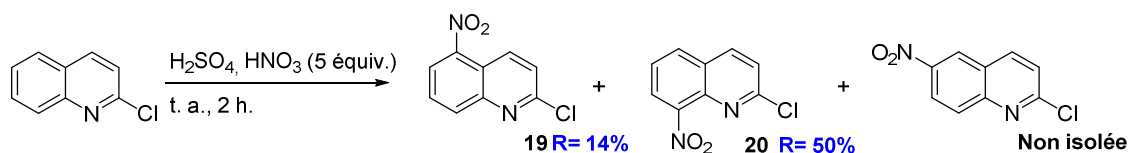
La molécule **16** a également été méthylée en utilisant un protocole décrit par Rosenhauer en 1924.<sup>336</sup> La réaction de la quinoléin-2(1H)-one **16** avec de l'iodure de méthyle dans du DMF pendant 48 h à 80 °C conduit à la formation de la *N*-méthylquinoléin-2(1H)-one **18** avec un rendement de 71%. La position du groupement méthyle (*O*- versus *N*-méthylation) a été déterminée par RMN du carbone. En effet, les déplacements chimiques des atomes de carbone  $sp^3$  portés par un atome d'azote sont moins déblindés que ceux des atomes de carbone  $sp^3$  portés par un atome d'oxygène. Ainsi, ce déplacement chimique est d'environ 35 ppm pour un (CO)-N(R)-CH<sub>3</sub> et d'environ 55 ppm pour un Ar-O-CH<sub>3</sub>.<sup>337</sup>



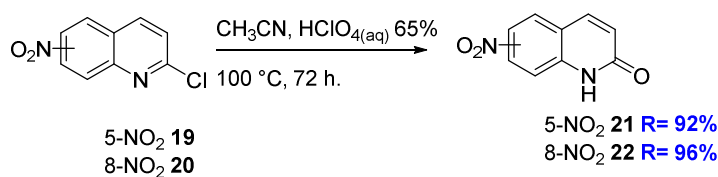
## 2.3.2. Synthèse de dérivés de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

### 2.3.2.1. Préparation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

L'avantage de la 2-chloroquinoléine est d'orienter majoritairement la réaction de nitration en position 8 puis de permettre la transformation du motif chloroimine en lactame. La première étape a été la réaction de nitration de la 2-chloroquinoléine par le mélange sulfonitrique, dans des conditions précédemment décrites.<sup>323</sup> La 2-chloro-8-nitroquinoléine a ainsi été obtenue avec un rendement de 47%, du fait de la formation d'isomères de position : la 2-chloro-5-nitroquinoléine (14%) et la 2-chloro-6-nitroquinoléine, cette dernière n'ayant pas été isolée.



La seconde étape est la formation du motif lactame, dans les mêmes conditions que celles décrites lors de la synthèse de la molécule **16** (Méthode A). Ainsi, la 5-nitroquinoléin-2(1H)-one a été obtenue avec un rendement de 92%. Le même protocole a permis de former la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one avec un rendement de 96%.

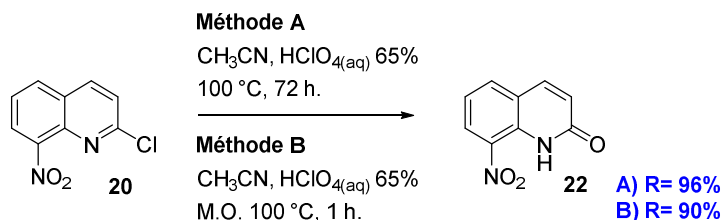


<sup>336</sup> E. Rosenhauer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1924**, 57, 1291-1294.

<sup>337</sup> <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/c13-data/cdata.htm>, consulté le 25/07/2018.

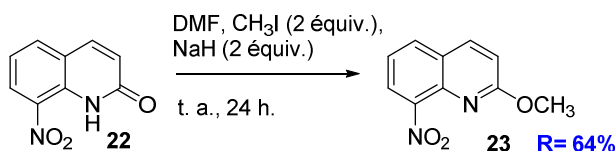
<sup>323</sup> L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 54, 75-86.

Afin d'optimiser cette réaction, nous avons décidé de transposer ces conditions à une synthèse sous irradiation micro-ondes et avons réussi à réduire le temps de réaction de 72 à 1 h, avec un rendement du même ordre de grandeur (Méthode B).



### 2.3.2.2. Méthylation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

La molécule **22** a par la suite été engagée dans une réaction de méthylation selon un protocole adapté de M. Naik,<sup>338</sup> utilisant l'iodure de méthyle, l'hydrure de sodium et le DMF. La molécule **23** a ainsi été isolée avec un rendement de 64%. A la différence de la méthylation de la quinoléin-2(1H)-one **16** qui avait conduit au dérivé *N*-méthylé, la méthylation de **22** a conduit au dérivé *O*-méthylé. C'est l'analyse par RMN <sup>13</sup>C qui nous permet de conclure *via* un déplacement chimique de l'atome de carbone du groupement méthyle à 54,1 ppm, caractéristique du déplacement chimique de l'atome de carbone d'un groupement méthyle lié à un atome oxygène. A titre de comparaison le déplacement chimique de l'atome de carbone du groupement méthyle de la *N*-méthylquinoléin-2(1H)-one **18** était de 29,4 ppm.



### 2.3.2.3. Halogénéation en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

#### 2.3.2.3.1. Préparation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

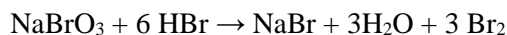
L'objectif était ici d'halogéner sélectivement la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22** en position 3 afin d'étudier l'influence de la présence d'un atome d'halogène en cette position sur l'activité antiparasitaire, par comparaison avec les travaux réalisés en position 4 de ce pharmacophore en 2015.<sup>324,325</sup> L'idée était aussi d'introduire par la suite différents substituants en cette position notamment *via* des couplages pallado-catalysés afin de poursuivre les études de relation structure-activité.

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5419-5434.

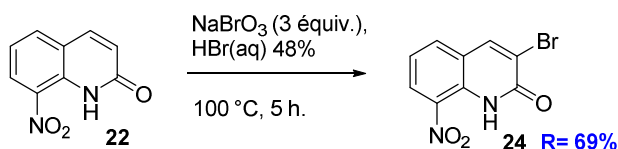
<sup>324</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 92, 282-294.

<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.

La 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one a ainsi été synthétisée selon un protocole adapté de O'Brien utilisant du bromate de sodium ( $\text{NaBrO}_3$ ) dans de l'acide bromhydrique à reflux.<sup>339</sup> Au cours de cette réaction, le bromate de sodium va réagir avec l'acide bromhydrique et générer du  $\text{Br}_2$  *in situ*, selon la réaction :

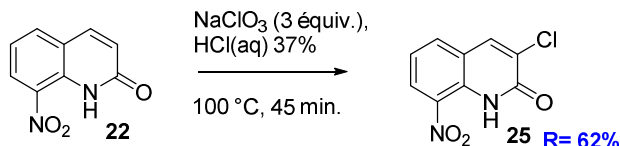


La 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** a ainsi été isolée avec un rendement de 69%.



#### 2.3.2.3.2. Préparation de la 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

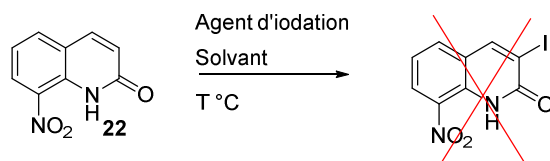
Afin d'obtenir l'analogue chloré, nous avons adapté le protocole de O'Brien en utilisant du chlorate de sodium ( $\text{NaClO}_3$ ) dans de l'acide chlorhydrique à reflux. La molécule **25** est ainsi générée avec un rendement de 62%.



#### 2.3.2.3.3. Essais d'iodation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Une fois la préparation de dérivés bromés et chlorés en position 3 effectuée, nous avons souhaité synthétiser la 3-iodo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one. Pour cela nous avons essayé sans succès plusieurs protocoles décrits dans la littérature, en faisant varier la nature de l'agent d'iodation, la nature du solvant et la température. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 :

<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.



Agent d'iodation	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)
NIS	CH <sub>3</sub> CN	85	24	Pas de réaction
	CHCl <sub>3</sub>	65	24	
	CCl <sub>4</sub>	80	24	
I <sub>2</sub>	NaOH / KI	100	24	Pas de réaction
	CH <sub>3</sub> COOH	120	24	
	CHCl <sub>3</sub>	65	24	
	CCl <sub>4</sub>	80	24	
	HI	100	0,25	Dégradation du substrat
	HI	De t.a. à 75	12	

**Tableau 12 :** Essais d'iodation en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Les premiers essais ont été réalisés en adaptant un protocole d'iodation décrit par Nanashima utilisant du *N*-iodosuccinimide dans de l'acétonitrile à reflux.<sup>340</sup> Au bout de 24 h, aucune évolution de la réaction n'a été détectée lors du suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Deux autres essais ont été effectués en changeant le solvant de réaction par du chloroforme ou du tétrachlorure de carbone, deux solvants fréquemment utilisés dans le cadre d'halogénations. Néanmoins, aucun nouveau produit ne s'est formé après 24 h à reflux.

Plusieurs nouveaux essais ont alors été effectués en utilisant le diiode. Deux protocoles présents dans la littérature ont été adaptés à cette réaction, utilisant un milieu aqueux basique ou un milieu acide organique.<sup>341,342</sup> Cependant dans les deux cas, aucun produit ne s'est formé après 24 h à reflux. Aucune progression de la réaction n'a également été observée en présence de diiode dans des solvants organiques comme le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone.

L'utilisation de diiode en présence d'acide iodhydrique à reflux n'a pas permis d'obtenir le dérivé iodé en position 3. En effet lorsqu'un chauffage à 100 °C est appliqué, le produit se dégrade. Un protocole plus doux a donc été suivi en partant de la température ambiante. Si aucune progression de la réaction n'a été observée après 8 h à t.a. ni après 8 h à 40 °C, un chauffage à 75 °C a très rapidement dégradé le substrat, comme indiqué par la présence de nombreuses tâches lors du suivi par CCM.

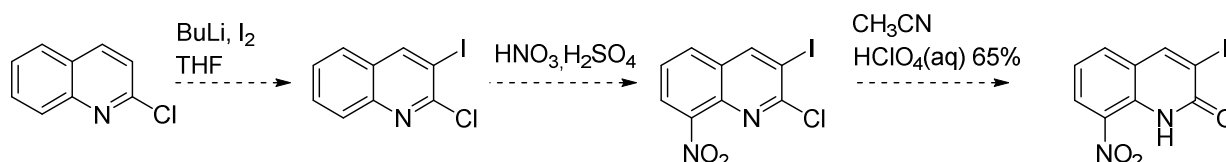
<sup>340</sup> Y. Nanashima, A. Yokoyama et T. Yokozawa, *Macromolecules*, **2012**, 45, 2609-2613.

<sup>341</sup> H. P. Kokatla, D. Sil, S. S. Malladi, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 6871-6885.

<sup>342</sup> Y. Koseki, T. Sugimura, K. Ogawa *et al.* *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 18, 4024-4032.



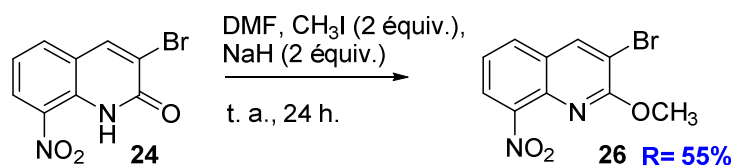
Une alternative possible afin de synthétiser la 3-iodo-8-nitro-quinoléin-2(1*H*)-one serait d'inverser la séquence réactionnelle. En effet, il existe des protocoles dans la littérature qui décrivent l'iodation en position 3 de la 2-chloroquinoléine *via* l'utilisation d'une base forte et de diiode.<sup>343</sup> Par la suite, une seconde étape de nitration en milieu sulfonitrique devrait permettre d'isoler la 2-chloro-3-iodo-8-nitroquinoléine. Enfin la dernière étape serait la transformation du motif chloroimine en lactame selon un protocole déjà décrit auparavant pour obtenir la 3-iodo-8-nitro-quinoléin-2(1*H*)-one.



### 2.3.3. Synthèse de dérivés de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

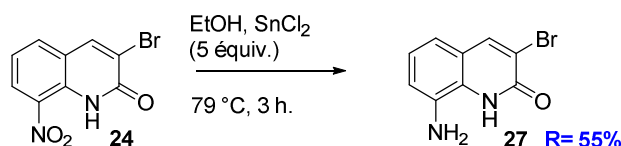
#### 2.3.3.1. Méthylation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

La 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** a été engagée dans une réaction de méthylation selon le même protocole que celui décrit pour la molécule **18**, utilisant de l'iodure de méthyle et de l'hydruide de sodium dans du DMF à température ambiante. La molécule **26** a été obtenue avec un rendement de 55%. La RMN <sup>13</sup>C a permis d'identifier le produit de *O*-méthylation *via* l'observation du déplacement chimique de l'atome de carbone du groupement méthyle à 55,4 ppm.



#### 2.3.3.2. Réduction de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

Afin de vérifier l'importance du groupement NO<sub>2</sub> dans l'activité antiparasitaire des molécules de cette série, nous avons réduit la molécule **24** selon un protocole utilisant du chlorure d'étain (II). Après 3 h à reflux dans de l'éthanol, le dérivé aminé **27** a été isolée avec un rendement de 55%.



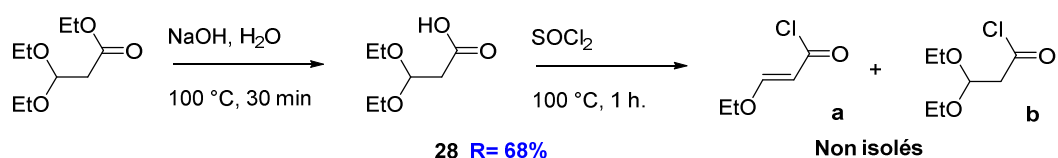
<sup>343</sup> F. Marsais, A. Godard, G. Queguiner, *J. Heterocycl. Chem.*, **1989**, 26, 1589-1594.

## 2.4. Synthèse de 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-ones fonctionnalisées à partir de nitroanilines.

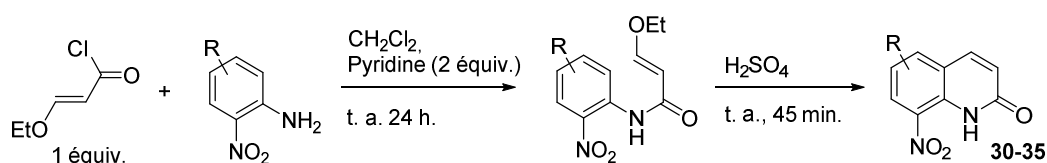
Afin d'introduire de nouveaux substituants sur la partie benzénique de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, nous avons choisi une voie synthétique multi-étapes utilisant comme substrats des nitroanilines.

### 2.4.1. Synthèse de dérivés substitués sur la partie benzénique du pharmacophore.

Nous avons choisi de suivre le protocole expérimental décrit par Zaragoza, permettant de préparer, en 4 étapes, des dérivés de quinoléin-2(1*H*)-ones à partir du 3,3'-diéthoxypropionate d'éthyle et d'une nitroaniline.<sup>344</sup>



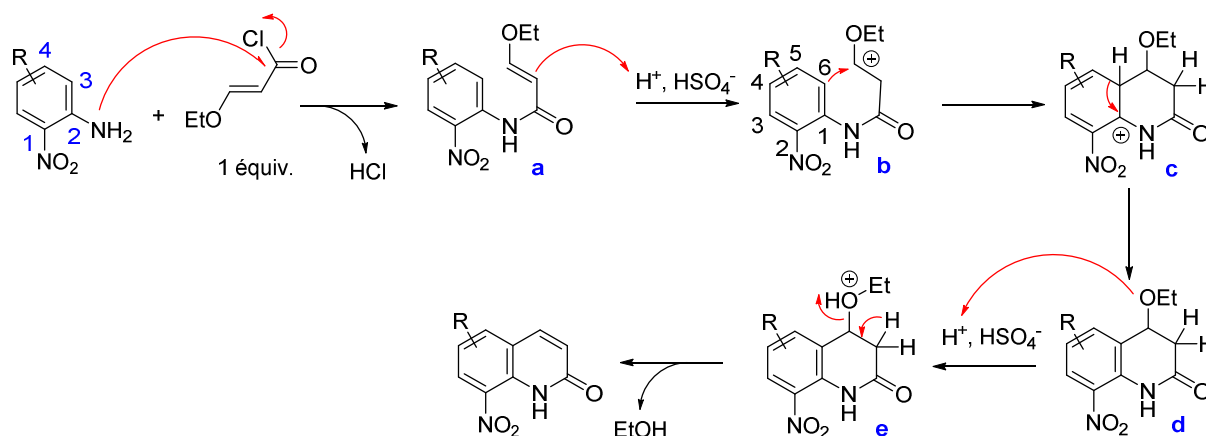
La première étape de cette synthèse consiste en la réaction de saponification du 3,3'-diéthoxypropionate d'éthyle commercial par de la soude. Nous avons ainsi obtenu l'acide 3,3'-diéthoxypropionique **28** avec un rendement de 68%. Ce composé est ensuite transformé en chlorure d'acyle par réaction avec le chlorure de thionyle. Au cours de cette seconde étape, un mélange de chlorure de 3-éthoxyacryloyle (**a**) et de chlorure 3,3'-diéthoxypropanoyle (**b**) est formé. Les molécules **a** et **b** n'ont pas été isolées : les chlorures d'acyle sont des molécules très réactives dont la purification est délicate. Nous avons ainsi suivi le protocole décrit par Zaragoza, où lors d'une troisième étape, le mélange des 2 chlorures d'acide est engagé dans la réaction avec un dérivé de nitroaniline formant par *N*-acylation un intermédiaire de type acrylamide.



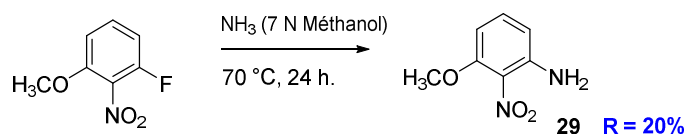
Enfin, une dernière étape de cyclocondensation dans l'acide sulfurique à 98% permet d'obtenir les dérivés attendus. Pour chacun de ces dérivés, l'intermédiaire *N*-acylé n'a pas été isolé mais est engagé directement dans la cyclisation intramoléculaire. Le mécanisme réactionnel proposé est présenté ci-dessous : le dérivé de type acrylamide **a** est tout d'abord formé *via* une attaque nucléophile du groupement amine aromatique sur le groupement carbonyle du chlorure d'acyle avec départ d'un ion chlorure et formation d'une molécule de HCl. Dans une seconde étape, l'addition électrophile en milieu acide d'un proton sur la double liaison en position  $\alpha$  du carbonyle va ensuite former un intermédiaire

<sup>344</sup> F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke *et al.*, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 306-311.

carbocationique **b**. Le cycle aromatique subit alors une substitution électrophile sur aromatique menant à la cyclisation intramoléculaire et la formation de l'intermédiaire de Wheland **c**. Cette cyclisation est suivie d'un transfert de proton qui permet d'éliminer la charge positive présente sur le cycle formant l'intermédiaire **d**. Enfin, dans une dernière étape, le groupement éthoxy est protoné (intermédiaire **e**) ce qui va favoriser son départ sous forme d'éthanol pour former une double liaison conjuguée avec le cycle aromatique lors d'un dernier transfert de proton, permettant la formation du dérivé de 8-nitroquinoléin-2(1H)-one correspondant.

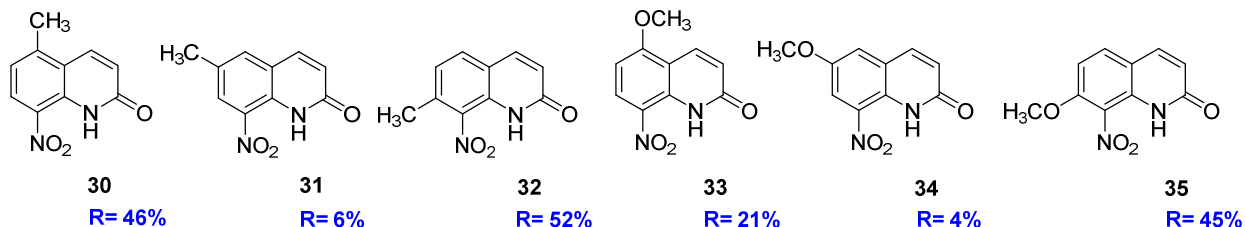


Si la majorité des nitroanilines engagées dans cette réaction ont été achetées, la 3-méthoxy-2-nitroaniline a été préparée dans un tube scellé à partir du 1-fluoro-3-méthoxynitrobenzène *via* une réaction de S<sub>N</sub>2 dans une solution méthanolique d'ammoniac 7 N. Après 24 h de réaction, la nitroaniline correspondante a été obtenue avec un faible rendement de 20%.



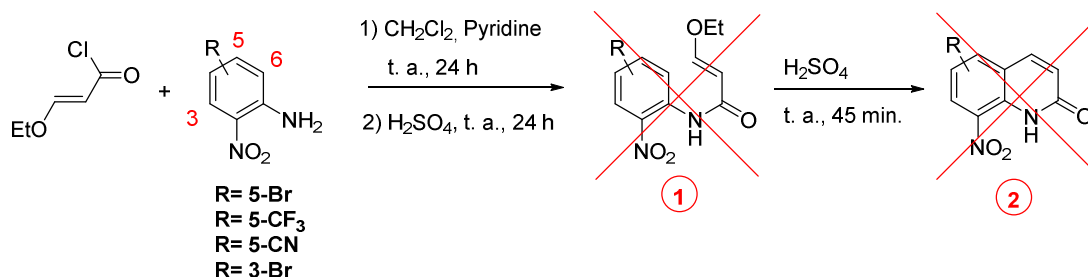
*Via* cette nouvelle voie de synthèse, 6 nouveaux dérivés ont été préparés. Ils possèdent un groupement méthyle ou méthoxy en position 5, 6 ou 7 et ont été obtenus avec des rendements variant de 4 à 52%. Le groupement méthyle est un groupement inductif donneur, il renforce la densité électronique au niveau de l'atome de carbone C<sub>6</sub> favorisant l'étape de substitution électrophile sur aromatique, ce qui est en accord avec les rendements obtenus pour les molécules **30** et **32**. Le groupement méthoxy est mésomère donneur et renforce également la densité électronique au niveau de ce carbone, ce qui est confirmé par les rendements de formation des molécules **33** et **35**. Enfin lorsque le groupement méthoxy est en position *méta* (molécules **34**) du carbone C<sub>6</sub>, il ne renforce pas suffisamment la densité électronique en cette position pour favoriser la substitution électrophile sur

aromatique (formation de l'intermédiaire **c**), ce qui se traduit par des rendements qui sont très bas. Seul le rendement de la molécule **31** est surprenant car malgré la présence d'un groupement méthyle en position *meta* de l'atome de carbone C<sub>6</sub>, il est de 6%.



#### 2.4.2. Limites de la préparation de ces dérivés *via* cette nouvelle voie de synthèse.

Nous avons ensuite voulu adapter ce protocole à des nitroanilines substituées par des groupements électroattracteurs tels que le groupement CF<sub>3</sub> ou par un atome d'halogène comme le brome.



Aucun des essais réalisés n'a été concluant ce qui nous indique que la présence de deux groupements électroattracteurs sur l'aniline semble défavorable au bon déroulement de la réaction. Cette hypothèse est confirmée par C. Janiak qui indique dans ses travaux que la présence d'un groupement nitro sur l'aniline pourrait empêcher toute cyclisation dans des conditions de réaction modérées.<sup>345</sup> Cette réaction n'est par ailleurs pas décrite dans la littérature à partir d'une 2-nitroaniline. Deux problèmes pourraient en effet se poser :

- 1) Une diminution de la nucléophilie du groupement amine aromatique qui défavoriserait l'attaque du groupement carbonyle du chlorure d'acyle, empêchant la formation de l'intermédiaire *N*-acylé. En effet, le groupement nitro en position *ortho* du groupement amino stabilise la délocalisation de son doublet d'électrons, le rendant moins disponible pour une attaque nucléophile.
- 2) Une diminution de la densité électronique au niveau du carbone C<sub>6</sub> du fait du cumul d'effets électroattracteurs empêchant la substitution électrophile sur aromatique. Des groupements électroattracteurs en position 5 appauvrissent donc la position 6 en électrons, ce qui pourrait empêcher la cyclisation menant au dérivé de nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

<sup>345</sup> C. Janiak, S. Deblon et L. Uehlin, *Synthesis*, **1999**, 6, 959-964.

Au cours de ce travail de synthèse organique, 15 molécules ont été préparées depuis des dérivés de la 2-chloroquinoléine, 6 molécules *via* une voie synthétique alternative utilisant des nitroanilines et 5 molécules *via* des voies de synthèse autres visant à accéder à des dérivés permettant de comprendre l'interaction entre le motif lactame et le groupement nitro du pharmacophore. Nous allons désormais étudier les propriétés électrochimiques et biologiques de ces différents dérivés avec pour objectif de tenter de rationaliser l'activité antiparasitaire en fonction des potentiels de réduction.

### 3. Etude électrochimique

L'électrochimie est la science qui étudie tous les phénomènes engendrés lorsqu'un milieu chimique électrolytique est en interaction avec un circuit électrique, elle permet notamment de mieux comprendre les réactions d'oxydo-réduction. Ce domaine étudie plus particulièrement des systèmes hétérogènes composés de conducteurs électroniques capables d'assurer le transport de charges par le mouvement des électrons (comme des métaux ou du carbone) et de conducteurs ioniques capables d'assurer le transport de charges par le mouvement d'ions (comme les électrolytes). C'est l'interface entre un conducteur électronique et un conducteur ionique qui est appelée électrode. Chaque électrode possède un potentiel d'électrode absolu qui correspond à la différence entre le potentiel du conducteur électronique et le potentiel du conducteur ionique qui la compose.

Cependant, si la mesure d'un potentiel est impossible, la mesure d'une différence de potentiel est réalisable. Pour cela des cellules électrochimiques sont utilisées. Il s'agit d'un montage à deux électrodes plongeant dans un électrolyte. L'électrode de travail correspond à l'électrode de mesure et l'électrode de référence est choisie pour sa particularité d'avoir un potentiel très stable dans le temps :

Il existe plusieurs types d'électrodes de référence. L'électrode normale à hydrogène (ENH) est composée d'une solution d'ions ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) de concentration 1 M en contact avec du dihydrogène gazeux ( $\text{H}_2$ ) à une pression de 1 bar et d'une tige de platine (Pt). Le couple redox mis en jeu est donc  $\text{H}^+(\text{aq}) / \text{H}_2(\text{g})$ . L'intérêt de cette électrode est que son potentiel est approximativement égal au potentiel standard du couple redox et ne dépend donc de rien excepté de la température. Elle a été choisie comme électrode de référence absolue et son potentiel a été arbitrairement fixé à 0. Cependant, elle est très peu utilisée pour des raisons pratiques. L'électrode au calomel saturée (ECS) est la plus couramment utilisée et sera l'électrode choisie au cours de cette étude. L'électrode ECS est une électrode de seconde espèce ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-(\text{sat})$ ) indicatrice d'anions, c'est l'activité des anions dans la solution qui fixe son potentiel. Lorsque la solution électrolytique est saturée en sel (anion), le système électrochimique est stable dans le temps, ces électrodes sont alors utilisées comme électrodes de référence. Son potentiel est de 0,241 V par rapport à l'ENH à 25 °C.

L'électrode de travail est l'électrode dont la surface sert de site pour la réaction de transfert d'électrons étudiée. Elle sert de transducteur d'un signal dont le potentiel est fonction de l'activité de l'analyte, quel que soit le courant qui traverse la cellule. Les plus utilisées sont les électrodes de mercure ou les électrodes composées de métaux nobles comme l'or, le platine ou encore une électrode de carbone vitreux.

Considérons maintenant une solution contenant le couple oxydoréducteur Ox/Red tel que



Le potentiel  $E$  de la solution est alors défini et calculable par la loi de Nernst (1) :

$$E = E_0^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}}$$

Dans cette équation,  $E_0^0$  est la constante appelée potentiel normal vrai caractéristique du système électrochimique considéré,  $F$  est la constante de Faraday (96500 C),  $n$  est le nombre d'électrons échangés,  $R$  est la constante des gaz parfaits (831447 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>),  $T$  est la température absolue (K) et  $a_{\text{Ox}}$  et  $a_{\text{Red}}$  sont les activités des espèces Ox et Red en solution.

Si, tout en envisageant de faire varier les concentrations des substances électroactives, on peut admettre que la force ionique va rester pratiquement inchangée, on peut alors appliquer la loi de Nernst en l'écrivant comme si les constituants en solution se comportaient idéalement, permettant de faire intervenir leur concentration à la place de leur activité. La constante qui regroupe le potentiel normal vrai et le terme comprenant les coefficients d'activité (terme qui reste invariable dans la mesure où la force ionique est constante) est appelée potentiel normal apparent (ou formel) et sera désignée par le symbole  $E^0$ . Ainsi, lorsqu'une électrode solide constituée d'un conducteur métallique inattaquable est plongée dans la solution contenant le couple Ox/Red, celle-ci prend le potentiel noté :

$$E_{\text{eq}} = E^0 + \frac{0,058}{n} \lg \frac{c_{\text{Ox}}^{\text{sol}}}{c_{\text{Red}}^{\text{sol}}}$$

Ce potentiel peut être déterminé expérimentalement en mesurant la différence de potentiel  $\Delta E$  entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. La production d'une réaction électrochimique nécessite la réalisation de conditions rendant le potentiel d'électrode différent du potentiel d'équilibre, c'est-à-dire l'établissement d'un surpotentiel (ou surtension) d'électrode. Cela provoque une évolution du système oxydo-réducteur (plus ou moins rapide) tendant au rétablissement d'un nouvel état d'équilibre par modification de la composition de la solution au contact de l'électrode de travail. L'imposition de  $E \neq E_{\text{eq}}$  oblige la composition de la solution à se modifier au contact de l'électrode.

Ainsi :

- Si  $E - E_{eq} > 0$ , la solution dans laquelle plonge l'électrode va tendre à prendre le potentiel  $E$  imposé et le rapport  $C_{ox}/C_{red}$  des concentrations des espèces Ox et Red au contact de l'électrode va augmenter puisqu'une partie du réducteur passe à l'état oxydé selon la réaction rédox ( $Red \rightarrow ox + ne^-$ ). Cela se réalise par le transfert d'électrons dans le sens solution vers électrode (appelée alors anode).
- Si  $E - E_{eq} < 0$ , le rapport  $C_{ox}/C_{red}$  au contact de l'électrode va diminuer, puisqu'une partie de l'oxydant va se réduire selon la réaction rédox ( $Ox + ne^- \rightarrow Red$ ). Cela se réalise par le transfert d'électrons dans le sens électrode (appelée cathode) vers solution.

En résumé, lorsque l'on porte un potentiel  $E \neq E_{eq}$  à une électrode plongeant dans une solution contenant un couple oxydoréducteur, elle est traversée par un courant dont le sens dépend de la valeur du potentiel imposé (par rapport à  $E_{ref}$ ). Ainsi, le surpotentiel apparaît comme étant le facteur de production des réactions électrochimiques. La production d'une réaction électrochimique obéit à une loi quantitative, dite loi de Faraday reliant les nombres de moles  $N_{Ox}$  ou  $N_{Red}$  des substances Ox et Red électroactives transformées (produites ou consommées) à une électrode à la charge électrique totale  $Q$  ayant été transférée à travers l'interface électrode-solution :

$$N_{Ox} = N_{Red} = \frac{Q}{nF}$$

Selon la convention retenue en Europe,  $I > 0$  correspond à l'oxydation alors que  $I < 0$  correspond à la réduction. On distingue ainsi les deux sens possibles du transfert électronique.

Les méthodes électroanalytiques utilisent la propriété de certaines substances chimiques (matériaux ou solutions) à pouvoir échanger des électrons avec un conducteur électronique, la grande spécificité de l'électrochimie par rapport à d'autres domaines de mesures physiques, étant sa capacité à transformer chimiquement les espèces. Cet avantage peut être mis à profit pour produire des espèces tout en les analysant. Ces méthodes consistent, soit à imposer une différence de potentiel électrique, soit à faire passer un courant imposé entre deux électrodes plongées dans un milieu (gazeux, liquide ou solide) contenant la substance à analyser. Elles permettent notamment d'identifier une substance dans un milieu grâce à son « potentiel rédox ». Ce potentiel électrique est spécifique de l'espèce chimique et de son partenaire qui résulte de l'échange d'électron, c'est le but recherché dans ce travail.



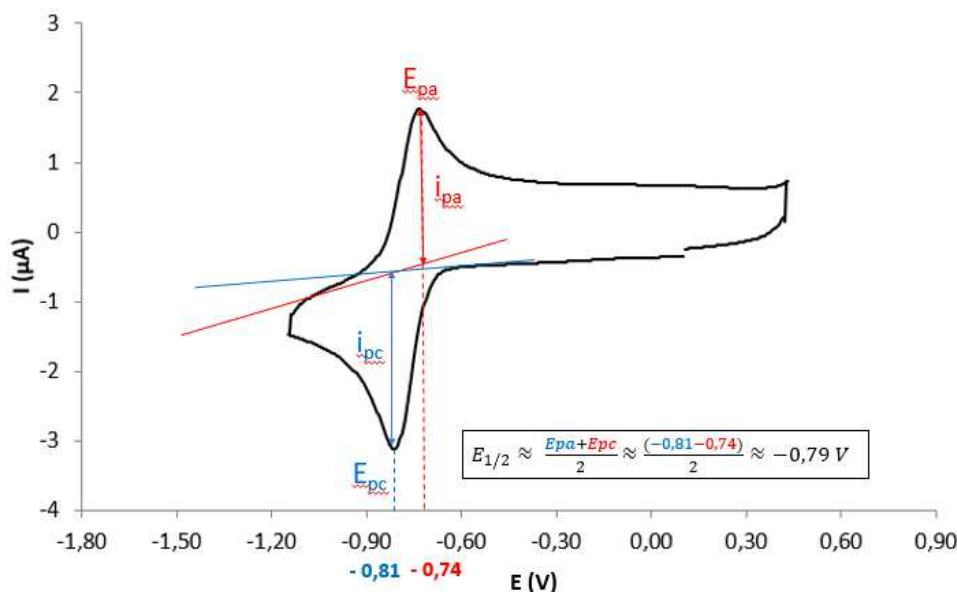
### 3.1.Principe de la voltampérométrie cyclique.

La voltampérométrie, ou en abrégé voltamétrie, est un nom général pour toutes les méthodes à balayage de potentiel pendant lesquelles on mesure le courant. Le balayage est dit linéaire lorsque sa vitesse est constante. Son utilisation la plus fréquente consiste à effectuer deux balayages linéaires, le premier dit "aller" et le second dit "retour" en sens inverse de façon à revenir au potentiel de départ, après avoir donc effectué un cycle. Dans ce cas on dénomme la méthode "Voltamétrie cyclique".

La voltamétrie n'atteint sa véritable puissance que lorsqu'on la pratique en aller-retour et à différentes vitesses de balayage. En effet le renversement du balayage a pour effet de retourner le mécanisme, c'est à dire soit réduire les espèces qui ont été oxydées par un balayage positif, soit l'inverse. Le test de réversibilité est donc immédiat et le degré d'irréversibilité ( l'éloignement de la cinétique du régime réversible) peut être quantifié. De plus lorsque l'espèce produite est instable ou entreprend une réaction chimique avec les réactifs présents, le fait de ne pas récupérer la totalité de l'espèce produite lors du balayage aller peut aussi être quantifié<sup>346</sup>.

Lorsque le transfert de charge se comporte réversiblement, la position du pic retour est exactement décalée par rapport au potentiel de demi-vague de la même valeur qu'à l'aller, ce qui signifie que la distance entre les pics aller et retour ( $\Delta E = E_{pc} - E_{pa}$ ) est égale à  $57/n$  mV à 298 K. On admet volontiers jusqu'à  $100/n$  mV dans les milieux organiques étant donnée les contraintes expérimentales et la difficulté à mesurer la position horizontale de tels pics avec précision. Il s'agit donc là d'un critère de réversibilité essentiel et d'un moyen pratique de mesurer le nombre d'électrons échangés. La quantification de la proportion de l'espèce électroactive à l'aller ( $I_{pc}$ ) et de l'espèce récupérée lors du retour ( $I_{pa}$ ) se fait approximativement par le tracé de la tangente intérieure aux deux pieds de pics et l'appréciation des distances des deux pics à cette tangente, qui sont égales en cas de récupération complète ( $I_{pa} = I_{pc}$  si réversible)

<sup>346</sup> N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy *et al.*, *J. Chem. Educ.*, 2018, 95, 197-206.



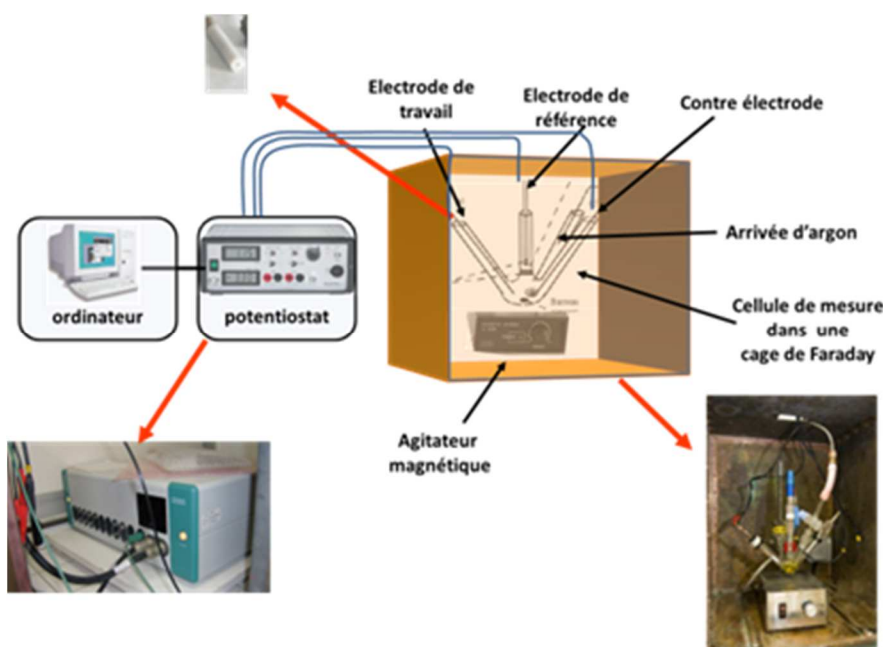
**Figure 63 :** Exemple de voltamogramme cyclique.

Par exemple, sur la figure 63, le domaine de potentiel choisi pour réaliser cette courbe en voltamétrie cyclique est compris entre 0,4 et -1,2V/ECS, ECS étant l'électrode de référence. Pour étudier le comportement en réduction de la molécule testée, le balayage aller se fera vers les potentiels négatifs. Une réduction est mise en évidence par l'apparition d'un pic caractérisé par son potentiel de pic ( $E_{pc} = -0,81$  V/ECS) et son intensité de pic ( $I_{pc} = -2,1$  µA), son pic retour correspondant à l'oxydation de l'espèce réduite, caractérisé par son potentiel de pic ( $E_{pa} = -0,74$  V/ECS) et son intensité de pic ( $I_{pa} = +2,1$  µA). La différence de potentiel entre les deux pics  $\Delta E = 70$  mV et le rapport des intensités  $R_{Ip} = \frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1$  valide la réversibilité du couple rédox étudié.

Lorsque la réversibilité du couple rédox a été démontrée, la valeur du potentiel d'oxydo-réduction standard  $E^\circ$  peut être estimé par la valeur expérimentale  $E_{1/2}$  qui représente la valeur moyenne entre  $E_{pc}$  et  $E_{pa}$  soit  $E_{1/2} = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2}$ . En effet, à  $E_{1/2}$ , la concentration en oxydant est égale à la concentration en réducteur et d'après l'équation de Nernst (1),  $E = E^\circ \approx E_{1/2}$ .  $E_{1/2}$ , étant indépendant des concentrations expérimentales, est alors une constante caractéristique du couple étudié, c'est lui qui sera reporté dans les tableaux suivants.

Les études électrochimiques réalisées dans le cadre de ce travail de thèse ont été effectuées à l'aide d'un ensemble potentio-galvanostatique, Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) piloté par le logiciel GPES version 4.9. La cellule électrochimique d'analyse comprend un montage à trois électrodes placées dans une cage de Faraday. Le choix des trois électrodes est dicté par le fait qu'il faut mesurer deux grandeurs physiques (une différence de potentiel et une intensité) en même temps. L'électrode de référence est une électrode au calomel saturée (ECS), l'électrode auxiliaire un tortillon

de platine et l'électrode de travail un disque de carbone vitreux de 1 mm de diamètre. Le comportement électrochimique des composés ( $10^{-3}\text{M}$ ) a été étudié dans un milieu comprenant du DMSO comme solvant et de l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium ( $\text{n-Bu}_4\text{NPF}_6$ ) à 0,1 M comme électrolyte support. Le DMSO a été choisi car les molécules à analyser sont solubles dans le DMSO, qu'il est largement utilisé en biologie et que son domaine d'électroactivité était suffisant pour mettre en évidence la première réduction. Le fait de choisir un solvant organique restreint alors le choix de sels. Ceux sont les sels d'ammonium qui sont le plus solubles dans ces solvants. Le  $\text{TBAPF}_6$  a été retenu car il est soluble dans le DMSO, qu'il ne réagit pas avec les molécules étudiées et qu'il est électroinactif dans le domaine d'électroactivité du DMSO. Avant chaque mesure la solution est dégazée et maintenue sous atmosphère d'argon et l'électrode de travail est polie à l'aide d'une polisseuse Presi P230 sur des disques de carbure de silicium de granulométrie P4000. Les potentiels expérimentaux mesurés par rapport à l'ECS sont ensuite donnés par rapport à ENH *via* l'ajout de 0,241 V.



**Figure 64 :** Exemple de montage expérimental d'une mesure de potentiels d'oxydo-réduction par voltampérométrie cyclique.

Dans la figure 65 est représenté un exemple de voltamogramme cyclique d'une molécule de la série : la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22**. Sur ce voltamogramme, un pic cathodique est observé à un potentiel de - 0,81 V correspondant à la réduction à un électron du groupement  $\text{NO}_2$  de la molécule **22** en son radical anion  $\text{NO}_2^{\bullet-}$ . Un pic anodique est également observé à - 0,75 V, correspondant quant à lui à l'oxydation du radical anion  $\text{NO}_2^{\bullet-}$  de la molécule **22**, précédemment généré, en groupement nitro. La réversibilité de cette réaction rédox est observable par la présence d'un courant inverse au retour du balayage de potentiel où l'intensité du courant est la même ( $i_{pc} = i_{pa}$ ).

Ainsi pour cette molécule **22** :  $E_{1/2} = \frac{(-0,81-0,75)}{2} = -0,78 \text{ V}$ , seulement la mesure a été réalisée avec l'électrode au calomel saturé comme électrode de référence. Le potentiel de réduction corrigé par rapport à l'électrode normale à hydrogène est donc  $E_{1/2} = -0,78 + 0,241 = -0,54 \text{ V}$ . Ce calcul a ainsi été réalisé pour chacune des molécules de cette série dont le potentiel a été mesuré.

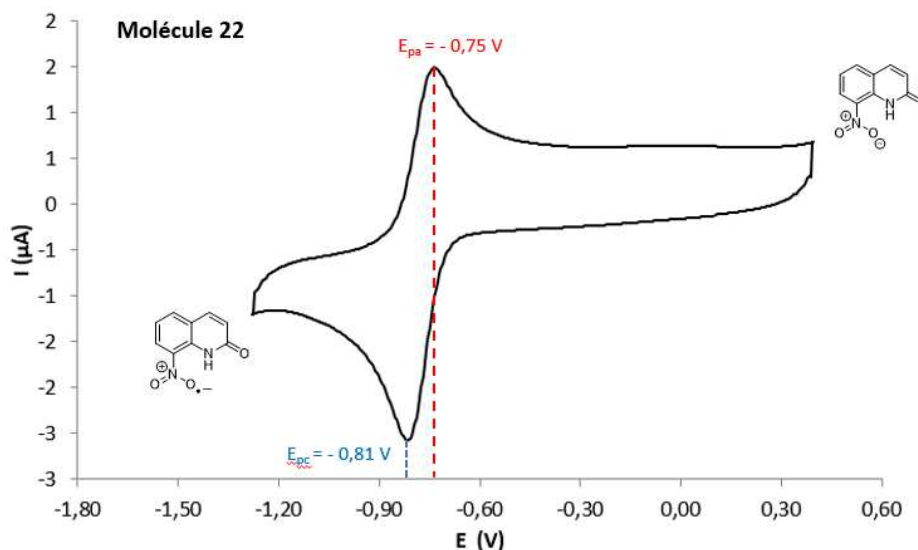


Figure 65 : Voltamogramme cyclique de la molécule **22**.

### 3.2. Développement d'un modèle théorique prédictif des potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Les travaux de synthèse que nous avons réalisés et présentés dans la première partie de ce chapitre, ont été orientés par une étude de chimie théorique. En effet, au lieu de synthétiser des molécules au hasard, nous avons fait appel à des méthodes de calculs *ab initio* pour estimer les potentiels d'oxydo-réduction d'hypothétiques dérivés de 8-nitroquinoléin-2(1H)-one. Notre objectif était d'explorer une large gamme de potentiels d'oxydo-réduction afin de mieux comprendre le rôle du potentiel d'oxydo-réduction dans l'activité biologique de cette série.

Dans la littérature, il existe des études portant sur la détermination des potentiels d'oxydo-réduction de composés nitroaromatiques dérivés du nitrobenzène par des méthodes de calculs *ab initio*.<sup>347,348</sup>. Ces études ont mis en évidence que la qualité des résultats était étroitement liée au choix de la base employée. Une base est un ensemble de fonctions utilisées afin de modéliser des orbitales moléculaires. La base 6-311++G(2d,2p) a été utilisée pour effectuer les calculs de potentiels redox. Elle représente un bon compromis entre précision des résultats et temps de calcul. La fonctionnelle de densité hybride M06-2x

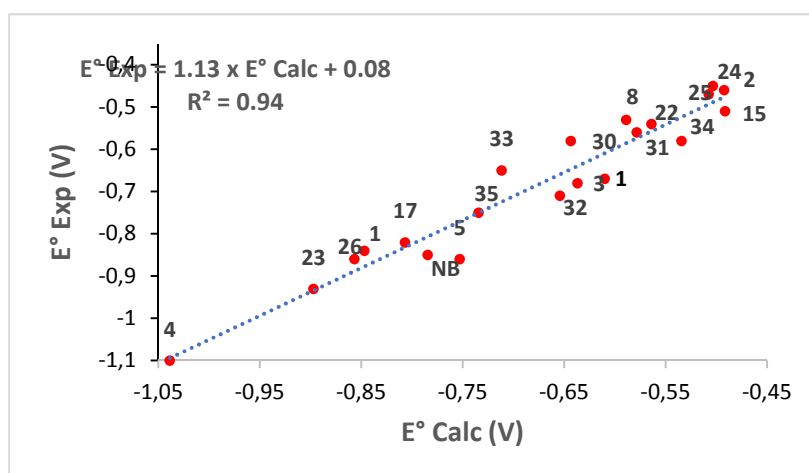
<sup>347</sup> R. I. Zubatyuk, L. Gorb, O. V. Shishkin *et al.*, *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 144-150.

<sup>348</sup> M. Uchimiya, L. Gorb, O. Isayev *et al.*, *Environ. Pollut.*, **2010**, *158*, 3048-3053.

a été choisie comme méthode de DFT pour sa précision dans les calculs des paramètres thermochimiques. Le calcul des fréquences vibrationnelles sur les molécules optimisées a permis, d'une part de confirmer que les composés étudiés étaient bien dans une géométrie correspondant à un minimum local et d'autre part, d'accéder aux paramètres thermodynamiques nécessaires au calcul de l'énergie libre à 298 K. Les potentiels d'oxydo-réduction correspondant à la réduction à 1 électron du groupement NO<sub>2</sub> de dérivés de nitroquinoléin-2(1H)-ones en son radical anion NO<sub>2</sub><sup>•-</sup> ont finalement été calculés d'après la loi de Faraday *via* l'équation suivante :

$$E^{\circ} = -\frac{\Delta G_{red}}{nF} + E_H^0$$

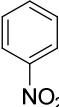
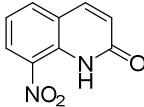
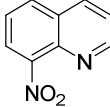
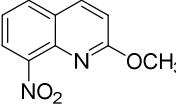
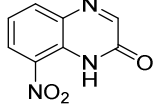
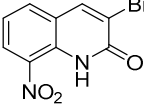
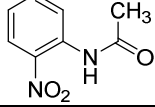
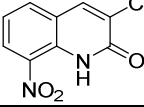
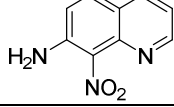
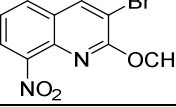
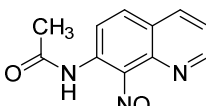
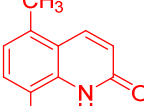
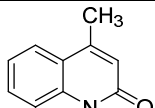
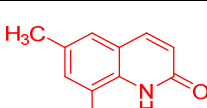
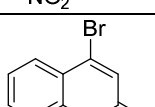
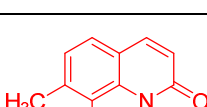
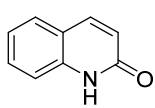
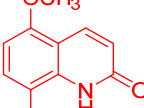
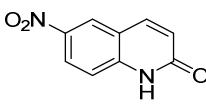
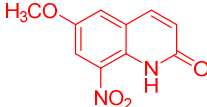
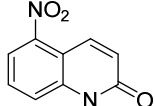
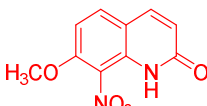
Où «  $\Delta G_{red}$  » représente l'énergie libre de réduction de Gibbs (soit la différence d'énergie libre entre la forme NO<sub>2</sub> et la forme NO<sub>2</sub><sup>•-</sup> de la molécule testée), « n » le nombre d'électrons transférés (ici un électron), « F » la constante de Faraday et «  $E_H^0$  » le potentiel standard de l'électrode normale à hydrogène (ENH) dont la valeur a été prise égale à - 4,28 V. Ces calculs ont été réalisés sur le cluster du laboratoire qui possède un nœud à 8 processeurs. Le calcul du potentiel de réduction d'une molécule dure environ 12 heures.



**Figure 66 :** Corrélation entre les potentiels de réduction mesurés par voltampérométrie cyclique et les potentiels de réduction calculés par DFT en série nitroquinoléin-2(1H)-one.

Les valeurs calculées de ces potentiels d'oxydo-réduction de dérivés nitrés ont alors été comparées aux valeurs expérimentales obtenues par voltampérométrie cyclique et sont présentées ci-dessous (Figure 66). Une corrélation est observée entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques avec une pente de la corrélation proche de 1 et un coefficient de corrélation R, de 0,94. On peut donc en conclure que ce modèle, développé dans notre équipe par le Dr Jean-Luc Stigliani, est très prédictif des potentiels de réduction du noyau 8-nitroquinoléin-2(1H)-one. Ce modèle a donc été utilisé pour choisir les molécules les plus intéressantes à synthétiser et à évaluer *in vitro* pour des activités antiparasitaires, comprenant les molécules **30** à **35**. Les résultats de cette étude électrochimique vont maintenant être présentés et discutés dans la suite de ce chapitre.

### 3.3. Résultats

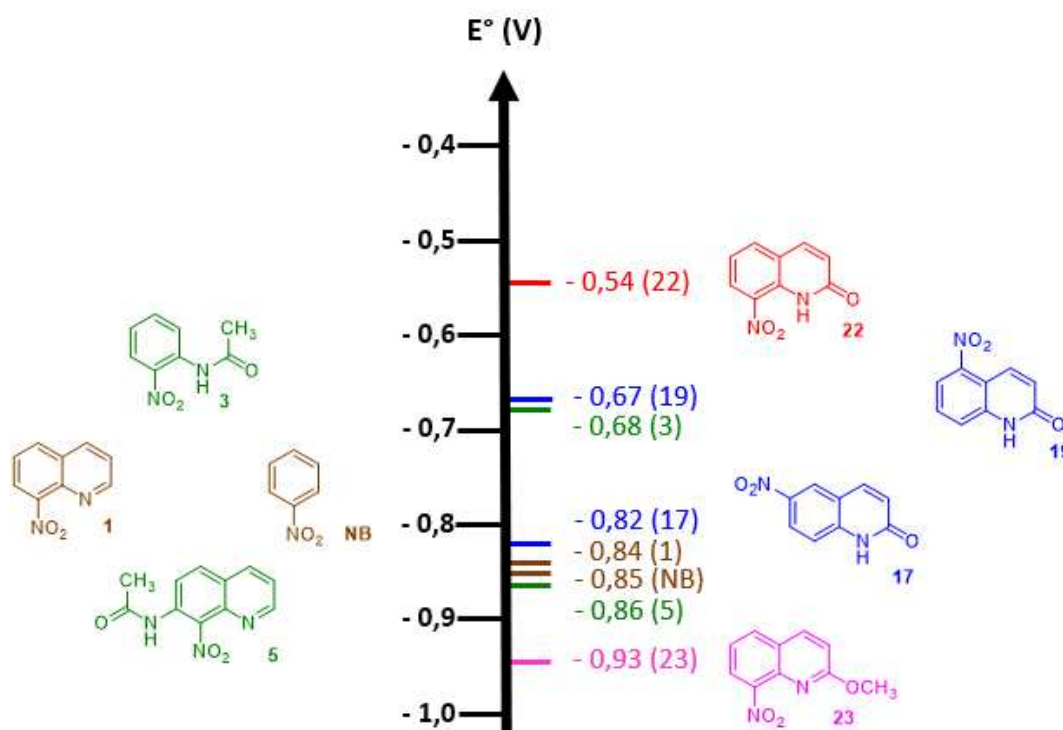
N°	Structure	E° (V/ENH) (cLog P)	N°	Structure	E° (V/ENH) (cLog P)
NB		- 0,85 (1,91)	22		- 0,54 (1,54)
1		- 0,84 (2,07)	23		- 0,93 (2,51)
2		- 0,46 (1,2)	24		- 0,45 (2,36)
3		- 0,68 (1,15)	25		- 0,47 (2,2)
4		- 1,1 (1,89)	26		- 0,86
5		- 0,86 (1,31)	30		- 0,58 (2,05)
8		- 0,53 (2,05)	31		- 0,56 (2,05)
15		- 0,51 (1,86)	32		- 0,71 (2,05)
16		- 1,86	33		- 0,65 (1,38)
17		- 0,82 (1,54)	34		- 0,58 (1,38)
21		- 0,67 (1,54)	35		- 0,75 (1,38)

**Tableau 13 :** Structures, potentiels de réductions des molécules synthétisées mesurés par voltampérométrie cyclique (DMSO/TBAPF<sub>6</sub>, ECS/CV, couple rédox NO<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et logP calculés *via* le logiciel Marvin®. Les valeurs de potentiels de réduction sont corrigées par rapport à l'ENH (+ 0,241 V), les composés en rouge sont ceux qui ont été proposés par les travaux de modélisation moléculaire.

### 3.4.Discussion

#### 3.4.1. Présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire et influence sur le potentiel de réduction.

Afin d'étudier le pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one, nous avons réalisé une analyse électrochimique des molécules synthétisées, *via* la mesure de leur potentiel de réduction par voltampérométrie cyclique. Notre objectif est ici d'étudier l'effet de l'interaction entre le motif lactame et le groupement nitro sur les potentiels de réduction correspondant au couple  $\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\bullet-}$ . Ces potentiels seront par la suite présentés sur des axes de potentiel d'oxydo-réduction et exprimés en Volt. Plus une valeur de potentiel rédox est élevée, plus la molécule  $\text{R-NO}_2$  aura un caractère oxydant prononcé et plus elle sera thermodynamiquement facile à réduire.



**Figure 67 :** Etude de l'effet de l'interaction entre le groupement  $\text{NO}_2$  et le motif lactame sur les potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

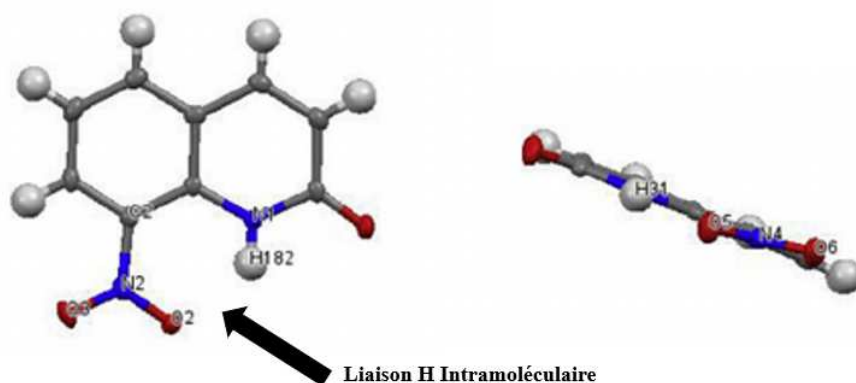
Le potentiel de réduction de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one (molécule **22**) qui possède une fonction lactame et un groupement  $\text{NO}_2$  en position 8 est de - 0,54 V (Figure 67). Lorsque la fonction lactame de cette molécule est supprimée (molécule **1**), le potentiel de réduction est significativement diminué de 0,3 V pour une valeur de - 0,84 V. Le noyau pyridine a par ailleurs peu d'effet sur le potentiel de réduction comme nous pouvons l'observer en comparant les valeurs de potentiels de la molécule **1** (- 0,84 V) et du nitrobenzène (- 0,85 V).



Lorsque ce motif lactame est conservé et que le groupement NO<sub>2</sub> est en position 5 (molécule **19**) ou 6 (molécule **17**) du pharmacophore, les potentiels de réduction sont nettement moins élevés que celui de la molécule **22** avec des valeurs respectives de - 0,67 et - 0,82 V.

Lorsque le motif lactame est supprimé par *O*-méthylation (molécule **23**), le potentiel de réduction diminue très significativement de - 0,39 V par rapport à celui de la molécule **22**, avec une valeur de - 0,93 V. L'association de la fonction lactame avec le groupement NO<sub>2</sub> en position 8 semble donc augmenter significativement le potentiel rédox des molécules de cette série.

Enfin, deux autres composés possédant une fonction amide extra-cyclique en position *ortho* du groupement NO<sub>2</sub> (molécules **3** et **5**) ont été évalués, leurs potentiels de réduction sont également moins élevés que celui de la molécule **22**, avec des valeurs respectives de - 0,68 et - 0,86 V.

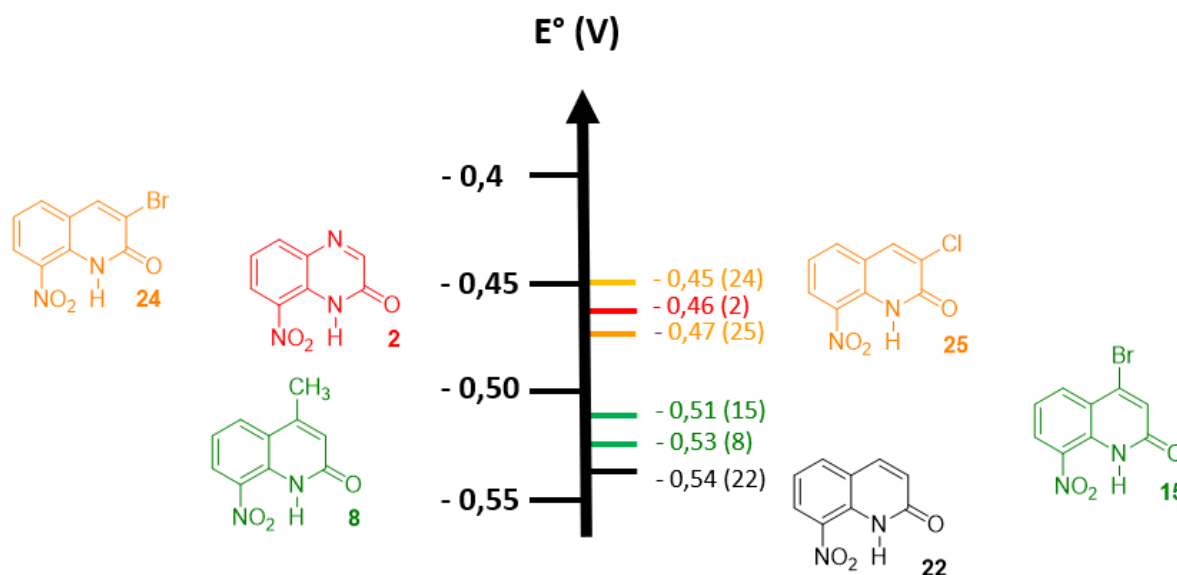


**Figure 68 :** Structure de la molécule **22** obtenue par diffractions aux rayons X.

C'est l'analyse par diffraction aux rayons X de ce pharmacophore qui nous a permis de comprendre pourquoi la molécule **22** présente une valeur de potentiel de réduction aussi élevée. En effet, cette molécule présente une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'hydrogène du motif lactame et l'un des atomes d'oxygène du groupement NO<sub>2</sub> (Figure 68). Les caractéristiques de cette liaison hydrogène intramoléculaire sont une distance N1-H182 de 0,89 Å, une distance O2-H182 de 2,01 Å et un angle N1-H182-O2 de 129 °C. La planéité de la molécule peut également être observée sur la figure 68, confirmant l'existence de cette liaison hydrogène.

Ainsi, lorsque le groupement amide est extra-cyclique, comme dans la molécule **3**, la disposition de la liaison amide ne sera plus contrainte par le cycle permettant une rotation plus libre autour de la liaison C-N, ce qui défavorise la formation de la liaison hydrogène. Cela se traduit par une valeur de potentiel de réduction moins élevée. Il est ainsi vraisemblable que la liaison hydrogène intramoléculaire, contribue à appauvrir le cycle en électrons et donc à accroître le caractère oxydant du noyau nitroaromatique.

### 3.4.2. Effets de la substitution de la partie pyridone du pharmacophore sur les potentiels de réduction.



**Figure 69 :** Etude de l'effet de la substitution de la partie pyridone du pharmacophore sur les potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

Suite à ces résultats, nous avons étudié l'effet de la modification de la partie pyridone du pharmacophore sur les potentiels de réduction, *via* l'introduction de substituants en position 3 et 4 ou l'ajout d'un atome d'azote supplémentaire dans la structure. Les résultats présentés dans la figure 69 indiquent que les potentiels de réduction de ces nouveaux dérivés varient entre - 0,45 et -0,53 V. L'introduction d'un groupement méthyle (inductif donneur) ou d'un atome de brome (inductif attracteur) en position 4 du pharmacophore n'a pratiquement aucun effet sur les potentiels de réduction, avec des valeurs très similaires à celles de la molécule **22**.

Au contraire, la présence d'un nouvel atome d'azote dans la structure (molécule **2**), qui aura tendance à appauvrir le cycle en électrons, ou l'introduction d'un atome d'halogène en position 3 (molécules **24** et **25**), provoquent une augmentation des potentiels de réduction de près de 0,1 V. La substitution de cet atome de Br (molécule **24**) par un atome de Cl (molécule **25**) induit une diminution du potentiel de réduction non significative de 0,02 V, indiquant un comportement électronique similaire de ces deux substituants. Ce résultat est un peu surprenant car l'atome de brome étant moins électro-négatif que l'atome de chlore, on aurait pu s'attendre à ce que l'atome de chlore augmente davantage la valeur de potentiel de réduction.

Une analyse par diffraction des rayons X de la molécule **24** a également été réalisée (Figure 70), une liaison hydrogène intramoléculaire est également présente, comme le montre notamment la planéité de la molécule. Les caractéristiques de cette liaison hydrogène intramoléculaire qui sont une distance N5-H51 de 0,84 Å, une distance O14-H51 de 2,01 Å et un angle N5-H51-O14 de 131 °C.

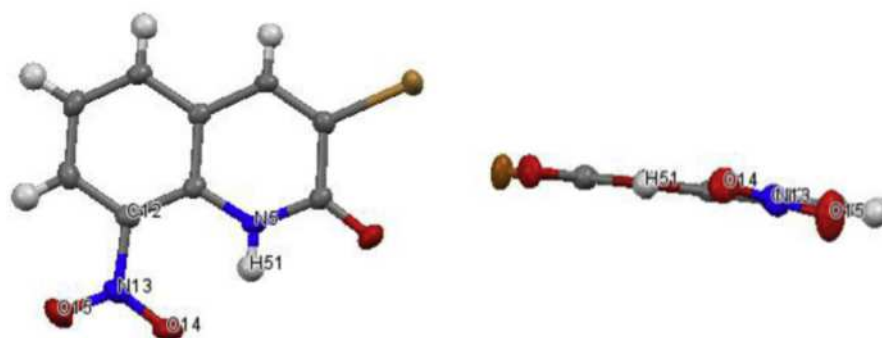


Figure 70 : Structure de la molécule **24** obtenue par diffractions des rayons X.

### 3.4.3. Effets de la substitution de la partie benzénique du pharmacophore sur les potentiels de réduction.

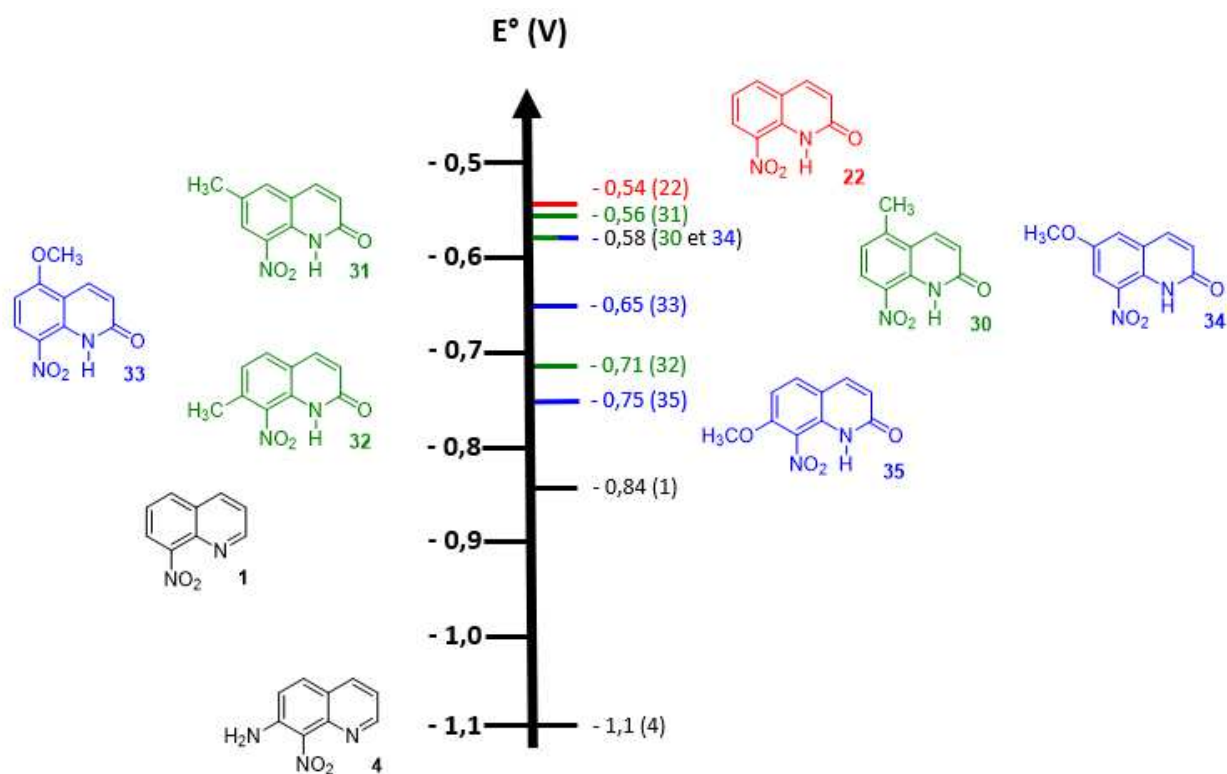


Figure 71 : Etude de l'effet de la substitution de la partie benzénique du pharmacophore sur les potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

Comme présentée dans la figure 71, l'introduction d'un groupement amine en position *ortho* du groupement nitro (molécule **4**) induit une forte diminution du potentiel de réduction par rapport à celui de la molécule **1**, avec une valeur de - 1,1 V. Ce groupement amine est un groupement mésomère donneur qui va enrichir la structure en électrons et donc rendre ce groupement nitro moins facile à réduire. Deux autres types de groupements ont été introduits aux positions 5, 6 et 7 du pharmacophore : un groupement méthyle qui est électrodonneur par effet inductif et un groupement méthoxy qui est mésomère donneur.

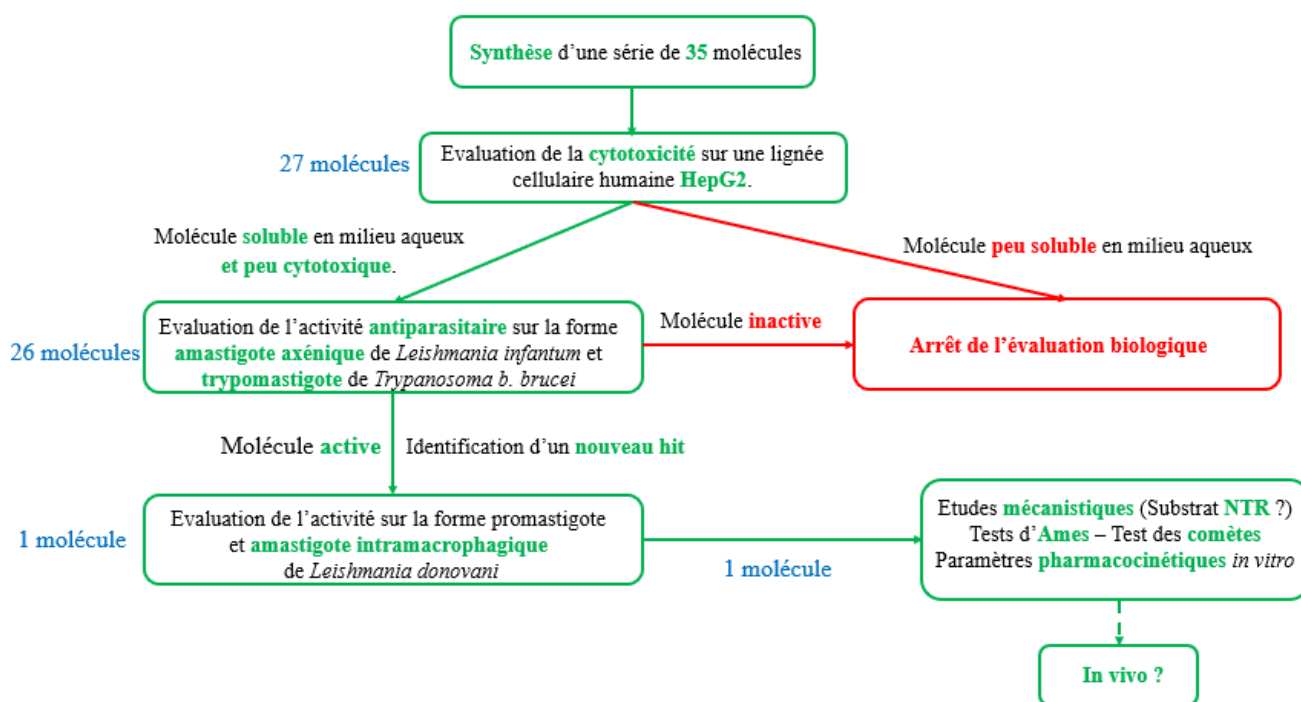
L'introduction du groupement méthyle en position 5 et 6 de la structure diminue faiblement le potentiel de réduction par rapport à celui de la molécule **22** avec des valeurs respectives de - 0,58 et - 0,56 V. A contrario, lorsque le méthyle est en position *ortho* du groupement nitro, le potentiel de réduction est significativement plus bas avec une valeur de - 0,71 V. En effet, lorsque le groupement méthyle est proche du groupement nitro, une gêne stérique pourrait défavoriser sa coplanéité avec le noyau quinoléin-2(1H)-one et donc déstabiliser la liaison hydrogène intramoléculaire, menant à des potentiels redox moins élevés.

L'introduction du groupement méthoxy en position 6 du pharmacophore a moins d'effet sur le potentiel de réduction que lorsqu'il est en position 5 ou 7, avec une valeur de - 0,58 V contre respectivement - 0,65 et - 0,75 V. Les groupements mésomères donneurs en position *ortho* et *para* du groupement nitro vont particulièrement renforcer la densité électronique du cycle nitroaromatique et ainsi le rendre plus difficile à réduire. Par ailleurs, la molécule **35** a un potentiel de réduction moins élevé que celui de la molécule **33** car lorsque le groupement méthoxy est en position *ortho* du groupement NO<sub>2</sub>, la gêne stérique occasionnée va défavoriser la coplanéité de ce dernier avec le cycle aromatique et affaiblir la liaison hydrogène intramoléculaire.

En résumé, les modulations du pharmacophore antileishmanien en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one ont permis de synthétiser des nouveaux dérivés possédant des potentiels de réduction (couple NO<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) compris entre - 0,45 V et - 1,1 V. La liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'hydrogène du motif lactame et l'atome d'oxygène du groupement NO<sub>2</sub> induit une augmentation d'environ 0,3 V de ce potentiel *via* l'appauvrissement du cycle en électrons. Sur la partie pyridone du pharmacophore, l'introduction d'un groupement inductif donneur ou attracteur en position 4 semble avoir moins d'effet sur le potentiel de réduction que l'introduction d'un atome d'halogène en position 3. Sur la partie benzénique du pharmacophore, la présence d'un groupement méthyle ou méthoxy en position 6 a peu d'effet sur le potentiel de réduction. Néanmoins, lorsqu'ils sont présents en position *ortho* du groupement nitro, les potentiels de réduction sont significativement moins élevés, probablement à cause d'effets stériques défavorisant la coplanéité du groupement nitro avec le cycle aromatique et donc déstabilisant la liaison hydrogène intramoléculaire.

A la suite de cette étude électrochimique, toutes les molécules synthétisées ont été évaluées *in vitro* sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum*, la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei* et sur la lignée humaine d'hépatocytes HepG2. L'un de nos objectifs est ici d'étudier le lien éventuel entre les potentiels de réduction et les activités biologiques des molécules de cette série, substrats potentiels des nitroréductases parasitaires.

#### 4. Evaluation de l'activité biologique *in vitro* des molécules synthétisées.



**Figure 72 :** Stratégie suivie pour l'évaluation biologique des composés synthétisés en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

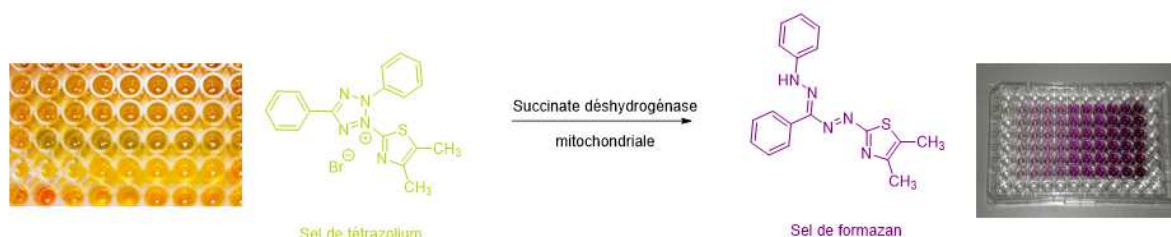
Au cours de ce travail nous avons choisi d'appliquer une stratégie de criblage afin d'éviter de tester des molécules peu solubles ou cytotoxiques (Figure 72). Ainsi, toutes les molécules ont été testées sur la lignée humaine HepG2 afin d'évaluer leur cytotoxicité. Ce pré-criblage nous a permis d'éliminer les molécules qui ne sont pas suffisamment solubles en milieu biologique et celles qui sont cytotoxiques. Toutes les molécules suffisamment solubles en milieu aqueux et non cytotoxiques ont alors été testées à la fois sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*, un autre parasite de la famille des *Trypanosomatidae*. Ce criblage primaire nous a ainsi permis d'éliminer toutes les molécules inactives. Les molécules les plus actives sur la forme amastigote axénique de *L. infantum* ont alors été testées sur une autre espèce de *Leishmania* (*Leishmania donovani*) au cours d'un criblage secondaire et surtout sur la forme amastigote intramacrophagique, modèle *in vitro* le plus représentatif de la physiopathologie de la leishmaniose viscérale. A la suite de

ces différentes étapes, 1 molécule de la série a été considérée comme un nouveau hit et des tests supplémentaires ont été réalisés afin d'évaluer son potentiel thérapeutique incluant des études mécanistiques, des tests de mutagénicité, de génotoxicité et la détermination de paramètres pharmacocinétiques *in vitro*.

#### 4.1. Evaluation de la cytotoxicité sur une lignée humaine.

Les molécules synthétisées dans le cadre de cette thèse ont été évaluées sur la lignée humaine HepG2 avec comme objectif d'évaluer leur cytotoxicité. Cette lignée cellulaire est très utilisée en chimie médicinale car elle possède la particularité d'être une lignée métabolisante, contenant certaines enzymes hépatiques et permet ainsi d'obtenir des informations sur la toxicité de la molécule testée mais également sur certains de ses métabolites.<sup>349</sup>

Ce test de cytotoxicité a été réalisé *via* un protocole expérimental adapté de celui décrit par Mosman<sup>350</sup>. Après une incubation des cellules en présence de la molécule testée pendant 72 h, le milieu de culture a été aspiré et une solution de sel de tétrazolium a été ajoutée dans chaque puits. Chaque cellule vivante post-incubation va oxyder ce sel de tétrazolium (jaune), *via* une déshydrogénase mitochondriale, en sel de formazan (violet) qui précipite dans le milieu biologique (figure 73). Le surnageant de chaque puits a ensuite été aspiré et du DMSO a alors été ajouté afin de solubiliser le sel de formazan formé.



**Figure 73 :** Oxydation du sel de tétrazolium en sel de formazan par la succinate deshydrogénase mitochondriale.


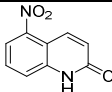

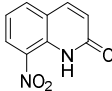
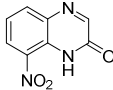
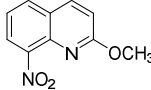
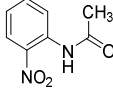
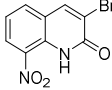
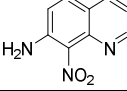
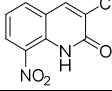
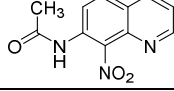
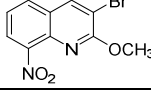
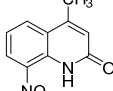
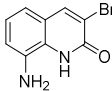
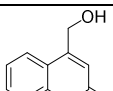
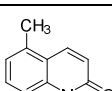
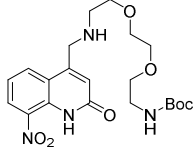
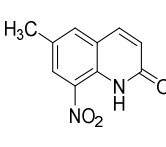
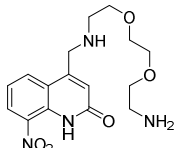
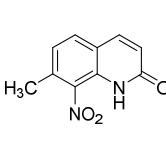
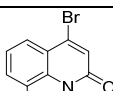
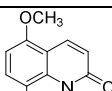
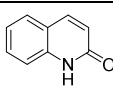
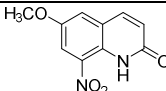
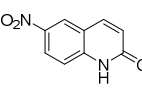
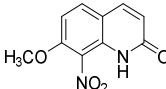
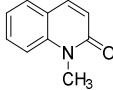
Ainsi, plus le sel de formazan est formé dans un puits, plus il y a de cellules vivantes. Pour mesurer quantitativement le nombre de cellules vivantes, les absorbances de chaque puits ont été mesurées à 570 nm *via* un spectrophotomètre (EonBioTek). L'intensité de la coloration violette mesurée par le spectrophotomètre est alors rapportée au nombre de cellules vivantes dans chaque puits. Pour chaque molécule, la concentration cytotoxique 50% correspond à la concentration de la molécule testée à laquelle 50% des cellules HepG2 sont tuées par rapport à un témoin ne contenant que du milieu de culture et un témoin contenant 0,05% de DMSO. Ces CC<sub>50</sub> sont répertoriées dans le tableau (Tableau 15). La doxorubicine est un agent anticancéreux cytotoxique qui est utilisé comme contrôle positif lors de tous ces tests.

<sup>349</sup> A. L. Roe, J. E. Snawder, R. W. Benson *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 190, 15-19.

<sup>350</sup> T. J. Mosman, *Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63



**Chapitre 3 : Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-kinétoplastidés.**

Numéro	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	Numéro	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	
NB		> 100	21		> 100	
1		> 100	22		164 ± 28	
2		125 ± 19	23		> 100	
3		> 100	24		92 ± 13	
4		> 100	25		85 ± 4	
5		> 100	26		> 6,2	
8		110 ± 9	27		> 100	
10		> 100	30		> 100	
12		> 100	31		> 100	
13		> 100	32		> 100	
15		60 ± 2	33		> 100	
16		> 100	34		> 100	
17		> 100	35		> 100	
18		> 100	Doxorubicine		0,2 ± 0,02	
			Suramine		>100	
Amphotéricine B		5,5 ± 0,25	Eflornithine		>100	
Miltéfosine		85 ± 8,8	Fexinidazole		>200	

**Tableau 15 :** Evaluation de la cytotoxicité des dérivés de 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones synthétisés.

Lors des études de pharmacomodulation antileishmanienne précédemment réalisées en position 4 de ce noyau, la solubilité avait été un facteur limitant en vue de découvrir un nouveau hit.<sup>324,325</sup> Les résultats de l'évaluation de la cytotoxicité de ces nouveaux dérivés indiquent que ces molécules sont, exceptés la molécule **26**, solubles en milieu aqueux. De plus, ces molécules sont globalement peu cytotoxiques avec des  $CC_{50} > 60 \mu M$  pour les 26 dérivés testés, 22 d'entre eux possédant une  $CC_{50}$  supérieure à  $100 \mu M$ .

#### 4.2. Evaluation de l'activité antileishmanienne.

Le test de criblage primaire est fréquemment réalisé sur la forme promastigote car la culture en laboratoire est plus simple que celle de la forme amastigote, qui est une forme intramacrophagique et qui nécessite donc une phase d'infection des macrophages. Par ailleurs, il existe une autre forme appelée amastigote axénique, forme amastigote extracellulaire. Les promastigotes sont ainsi forcés à se différencier en amastigotes *via* le changement des conditions de culture : le passage de 24 à 37 °C et d'un milieu de culture à pH 7,4 à un milieu acide au pH de 5,4, conditions similaires à celles du milieu intramacrophagique. Les tests sur cette forme amastigote axénique sont très intéressants en vue d'un criblage biologique car ils sont simples (ne demandant pas la culture et l'infection de macrophage) à mettre en place et réalisés sur la forme responsable de la maladie chez l'homme. De plus, si 94% du génome est commun aux deux formes du parasite, le protéome de *L. infantum* ne présente que 72% de similarité entre la forme promastigote et la forme amastigote, ce qui pointe un risque de faux positif ou de faux négatif lors d'un criblage primaire sur la forme promastigote.<sup>351</sup> Cependant, le test sur la forme axénique est moins représentatif que le test intramacrophagique<sup>352</sup> car il ne permet pas de donner d'information sur le passage de la membrane cellulaire du macrophage. C'est donc sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum*, l'un des deux principaux parasites responsables de la leishmaniose viscérale (LV) chez l'homme, que nous avons décidé de réaliser le criblage primaire de nos molécules, afin d'évaluer leur activité antileishmanienne *in vitro*. Seules les meilleures molécules seront évaluées par la suite sur la forme amastigote intramacrophagique, lors d'un criblage secondaire chez *L. donovani*, seconde espèce responsable de la LV.

Le principe de ce test, réalisé au laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le Développement de Toulouse dans l'équipe « Biocid », est basé sur l'expression de la luciférase, à l'origine d'une réaction de bioluminescence. En effet, les leishmanies utilisées dans ce test ont été modifiées génétiquement afin d'exprimer le gène de la luciférase. Cette enzyme est une monohydrogénase ATP-dépendante qui va

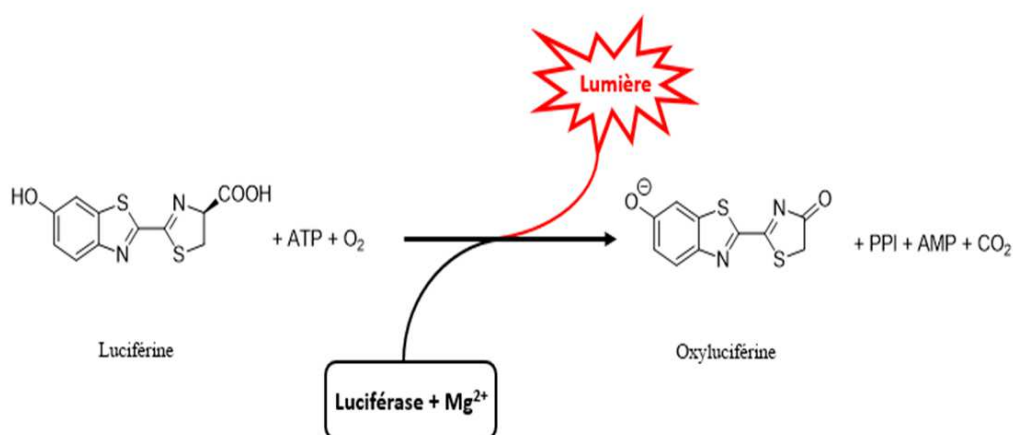
<sup>324</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 92, 282-294.

<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.

<sup>351</sup> K. Leifso, G. Cohen-Freue, N. Dogra, *et al. Biochem. Parasitol.* **2007**, 152, 35-46.

<sup>352</sup> M. A. Esteves, I. Fragiadaki, R. Lopes *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 274-281.

catalyser l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine en présence d'ATP, d'O<sub>2</sub> et de Mg<sup>2+</sup>, avec émission de lumière. Ainsi, à la fin du test d'évaluation de l'activité antileishmanienne, après une incubation de 48 h des parasites en présence de la molécule testée, une solution de luciférine est ajoutée dans chaque puit. Chaque parasite vivant va transformer cette luciférine en oxyluciférine *via* l'action de la luciférase et émettre de la lumière (Figure 74).



**Figure 74 :** Principe du test à la luciférase, transformation de la luciférine en oxyluciférine *via* la luciférase, à l'origine de l'émission de lumière.<sup>353</sup>

C'est cette émission de lumière qui est mesurée par un compteur de luminescence (PerkinElmer), plus le nombre de parasites vivants est important et plus l'intensité de la lumière émise est élevée. Ainsi une CI<sub>50</sub> est déterminée pour chaque molécule testée, elle correspond à la concentration de la molécule à laquelle 50% des parasites sont tués, en comparaison avec un témoin négatif ne contenant que du milieu de culture et un second témoin négatif contenant 0,05% de DMSO. Ces activités antileishmaniennes sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 16) et comparées à celles de molécules antileishmanienne de référence : l'amphotéricine B, la miltéfosine, la pentamidine et le fexinidazole.

<sup>353</sup> I. Navizet, Y-J. Liu, N. Ferré *et al.*, *ChemPhysChem*, **2011**, 12, 3064-3076.

Chapitre 3 : Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-kinétoplastidés.


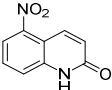

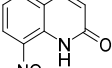
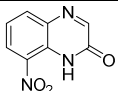
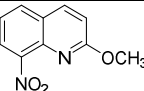
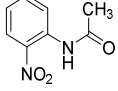
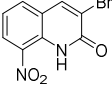
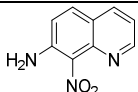
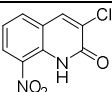
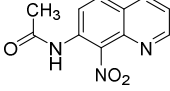
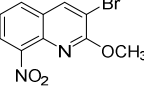
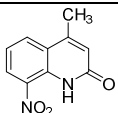
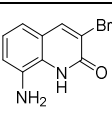
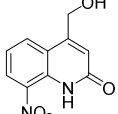
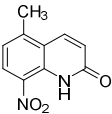
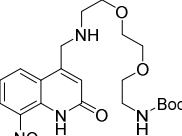
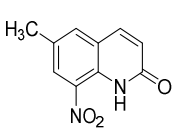
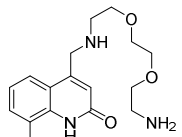
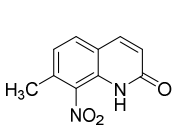
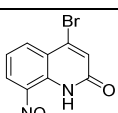
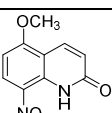
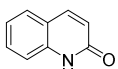
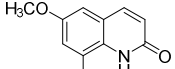
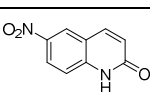
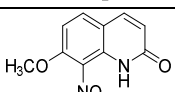
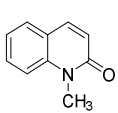
Numéro	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)	Numéro	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)
NB		> 100	21		> 100
1		> 100	22		<b>15,5 ± 0,5</b>
2		<b>11,0 ± 2,1</b>	23		88,8 ± 13,0
3		> 100	24		<b>7,1 ± 1,5</b>
4		> 100	25		<b>16,0 ± 0,9</b>
5		> 100	26		> 6,2
8		<b>10,2 ± 1,0</b>	27		> 50
10		<b>23,4 ± 4,8</b>	30		<b>25,2 ± 3,7</b>
12		> 100	31		<b>23,0 ± 5,0</b>
13		> 100	32		> 100
15		<b>20,3 ± 5,0</b>	33		> 100
16		> 100	34		> 100
17		> 100	35		> 100
18		> 100	Amphotéricine B		<b>0,06 ± 0,001</b>
			Miltéfosine		<b>0,8 ± 0,02</b>
			Fexinidazole		<b>3,4 ± 0,8</b>

Tableau 16 : Evaluation de l'activité antileishmanienne sur la forme amastigote axénique de *L.infantum*.

Sur les 26 molécules testées, 9 présentent des  $CI_{50}$  sur la forme amastigote axénique de *L. infantum* comprises entre 7  $\mu$ M et 25  $\mu$ M (en bleu dans le tableau). Par rapport au premier hit antileishmanien (molécule **22**) qui possède une  $CI_{50}$  de 15,5  $\mu$ M, l'introduction de groupements peu volumineux sur la position 4 mène à des dérivés avec un niveau similaire d'activité (molécule **8** et **10**). A contrario lorsqu'une longue chaîne de type aminoéthylèneglycol est introduite, l'activité antileishmanienne est perdue avec des  $CI_{50}$  supérieures à 100  $\mu$ M (molécule **12** et **13**). Par ailleurs lorsque le groupement  $NO_2$  n'est pas en position 8 du pharmacophore (molécule **17** et **21**) ou lorsqu'il est supprimé (molécule **16**, **18**, **27**), l'activité antileishmanienne est également perdue. Le même constat peut être réalisé lorsque le motif lactame est supprimé (molécule **1**, **4** et **23**) ou lorsqu'il est remplacé par une fonction amide extra-cyclique (molécule **3** et **5**).

L'introduction d'un groupement méthoxy en position 5, 6 et 7 du pharmacophore antileishmanien induit également une perte de l'activité (molécules **33**, **34** et **35**) tandis que celle d'un groupement méthyle mène à des dérivés au niveau d'activité similaire à celui de la molécule **22** (molécule **30** et **31**) ou à des dérivés inactifs (molécule **32**).

La molécule **24** (3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one) est celle qui présente la meilleure activité antileishmanienne avec une  $CI_{50}$  de 7,1  $\mu$ M. Cette molécule est 3 fois plus active que celle dont l'atome de brome est situé en position 4 du pharmacophore (molécule **15**) avec une  $CI_{50}$  de 20,3  $\mu$ M. Lorsque cet atome de brome en position 3 du pharmacophore est remplacé par un atome de chlore (molécule **25**), la  $CI_{50}$  est multipliée par deux. L'activité leishmanicide de la molécule **24** a donc été améliorée d'un facteur 2 par rapport au hit antileishmanien initial (molécule **22**), cependant ce gain d'activité est à contrebalancer avec une cytotoxicité deux fois supérieure. Ainsi, l'index de sélectivité ( $CC_{50}$  HepG2/ $CI_{50}$  *L. inf.*) du hit initial **22** et celui de la molécule **24** sont finalement très proches (respectivement de 10,5 et 12,9). La molécule **24** est environ 10 fois moins active que la miltéfosine, le médicament de référence administrable par voie orale et environ 2 fois moins active que le fexinidazole, une molécule récemment en études cliniques de phase II contre la LV. Cependant les index de sélectivité de ces deux molécules de référence sont beaucoup plus élevés (>58,8 pour le fexinidazole et 106,25 pour la miltéfosine) que celui de la molécule **24**. Cette molécule demeure néanmoins intéressante pour tenter d'optimiser ce pharmacophore ; ces travaux vous seront présentés dans les chapitres 4 et 5.

#### **4.3.Evaluation de l'activité anti-Trypanosoma.**

Toutes les molécules évaluées *in vitro* contre *Leishmania infantum* ont également été évaluées pour la première fois sur un autre trypanosomatidé, modèle de la trypanosomiase humaine africaine : *Trypanosoma brucei brucei*.

Les résultats sont présentés dans le tableau 17 et comparés avec ceux des molécules anti-*Trypanosoma* de référence incluant l'eflorinithine, la suramine et le fexinidazole.

Chapitre 3 : Etude du pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1H)-one: relations structure-activité, potentiel de réduction, mécanisme d'action et activité anti-kinétoplastidés.


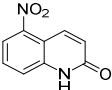

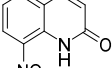
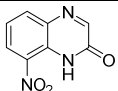
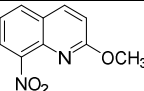
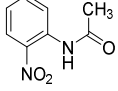
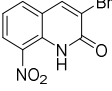
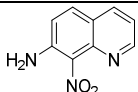
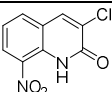
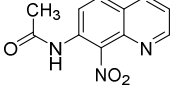
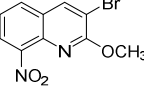
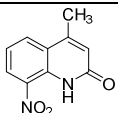
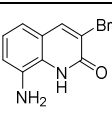
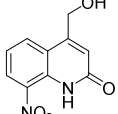
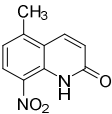
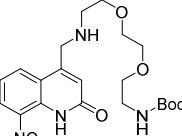
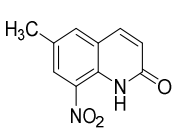
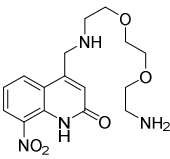
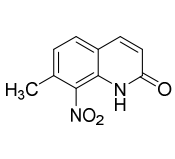
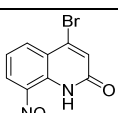
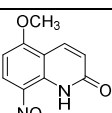
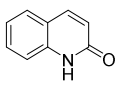
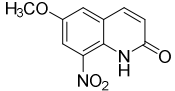
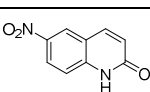
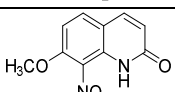
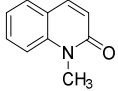
Numéro	Structure	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypanoma. (μM)	Numéro	Structure	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypanoma. (μM)
NB		> 50	21		> 50
1		<b>17,9 ± 1,8</b>	22		<b>23,4 ± 5,7</b>
2		<b>7,3 ± 0,8</b>	23		28,5 ± 8,1
3		> 50	24		<b>1,9 ± 0,4</b>
4		> 50	25		<b>1,2 ± 0,2</b>
5		<b>10,8 ± 1,4</b>	26		<b>0,4 ± 0,1</b>
8		<b>20,9 ± 8,9</b>	27		> 50
10		38,3 ± 6,1	30		29,1 ± 4,7
12		<b>2,5 ± 1,8</b>	31		<b>2,1 ± 0,8</b>
13		<b>7,6 ± 1,8</b>	32		> 50
15		<b>5,5 ± 1,3</b>	33		> 50
16		> 50	34		> 50
17		<b>2,3 ± 0,6</b>	35		> 50
18		> 50	Eflornithine		<b>15,8 ± 2,1</b>
			Suramine		<b>0,02 ± 0,009</b>
			Fexinidazole		<b>0,4 ± 0,2</b>

Tableau 17 : Evaluation de l'activité anti-*Trypanosoma brucei brucei* des dérivés de 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

Parmi les 26 molécules testées *in vitro* sur *Trypanosoma brucei brucei*, 13 possèdent des  $CI_{50}$  comprises entre 0,4  $\mu M$  et 25  $\mu M$  (en bleu dans le tableau). La présence du groupement nitro semble indispensable à une activité anti-*Trypanosoma* des dérivés de cette série, les molécules **16**, **18** et **27** ayant des  $CI_{50} > 50 \mu M$  sur ce parasite. Par ailleurs, au contraire du pharmacophore antileishmanien, la position 8 du groupement  $NO_2$  n'est pas obligatoire pour que la molécule garde une bonne activité anti-*Trypanosoma*, la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one (molécule **17**) étant 10 fois plus active que la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one (molécule **22**). Le motif lactame ne semble pas non plus indispensable à l'activité trypanocide car cette activité est partiellement conservée lorsqu'il est supprimé (molécule **1** et **26**) ou lorsqu'il est remplacé par une fonction amide extra-cyclique (molécule **5**). Le pharmacophore anti-*Trypanosoma* qui se dégage de ces résultats d'activités biologiques semble correspondre à une quinoléine nitrée avec des substituants en positions 3, 4 ou 6. Par ailleurs, les molécules avec les meilleures activités anti-*Trypanosoma* ( $\leq 2 \mu M$ ) sont des molécules substituées en position 3 (molécule **24**, **25** et **26**) ou en position 6 (molécule **17** et **31**), soulignant l'importance de ces deux positions dans l'action trypanocide. La molécule **24** est la molécule la plus active dans cette série sur *Leishmania infantum*, c'est également l'une des plus active sur *Trypanosoma brucei brucei* avec une  $CI_{50}$  de 1,9  $\mu M$ . Par ailleurs, cette molécule est 10 fois plus active que le hit initial (molécule **22**) qui présente une  $CI_{50}$  de 23,4  $\mu M$ , elle est aussi plus sélective avec un index de sélectivité de 48,4 contre 7 pour la molécule **22**. Ce dérivé est certes 100 fois moins actif et sélectif que la suramine (IS = 5000), médicament de référence contre le stade 1 de la THA, mais il est plus actif et sélectif que l'eflornithine (15,8  $\mu M$ , IS = 6,3), un autre médicament anti-*Trypanosoma* de référence. Enfin, cette molécule est certes 5 fois moins active et 10 fois moins sélective que le fexinidazole, mais son profil biologique prometteur va guider nos travaux de synthèse vers un potentiel lead anti-*Trypanosoma*.

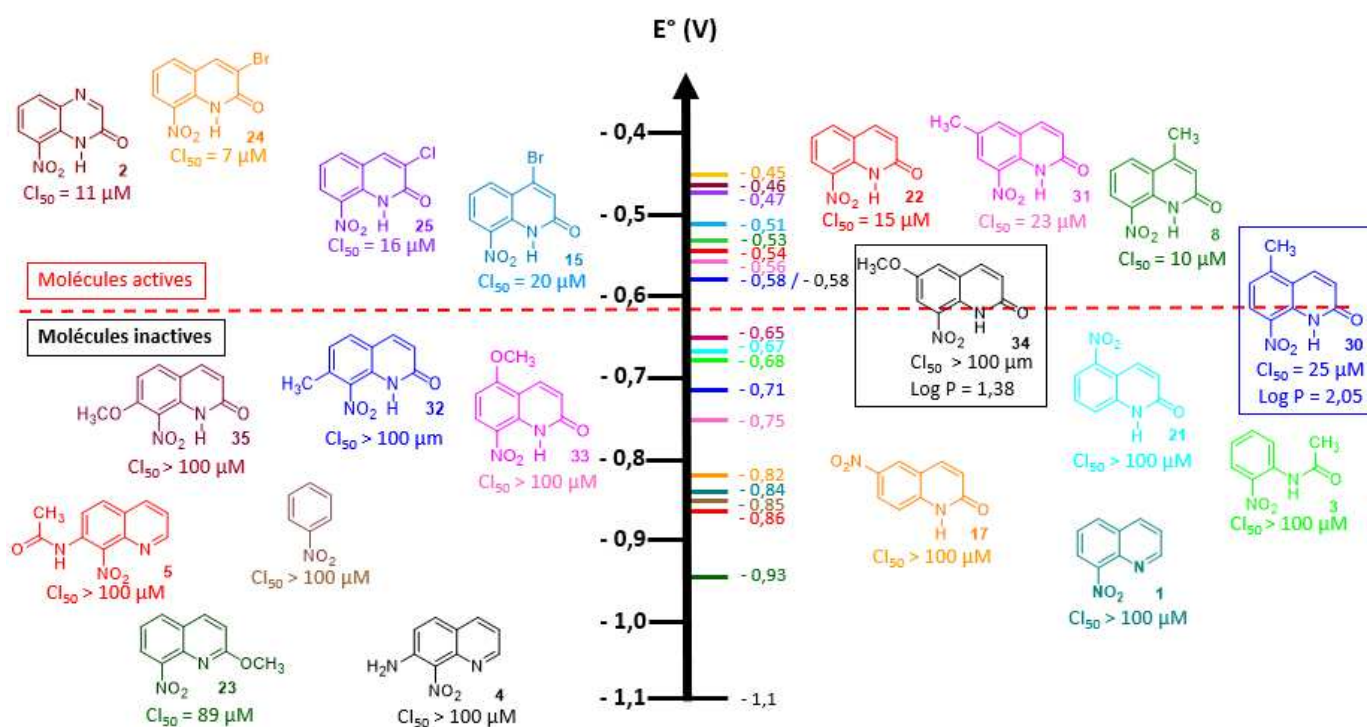
#### 4.4.Relation entre les activités antiparasitaires, les potentiels de réduction et les logP.

##### 4.4.1. Influence des potentiels de réduction et de la lipophile sur l'activité antileishmanienne.

Dans l'hypothèse d'une bioactivation des molécules de cette série par des nitroréductases parasitaires, il nous est apparu intéressant d'étudier les relations éventuelles entre les activités antileishmaniennes, les potentiels de réductions mesurés par voltampérométrie cyclique et les logP calculés *via* le logiciel Marvin®.

Pour chacune des 26 molécules évaluées, les résultats sont présentés dans la figure 75 :





**Figure 75 :** Etude du lien entre l'activité antileishmanienne sur la forme amastigote axénique de *L. infantum* et les potentiels de réductions.

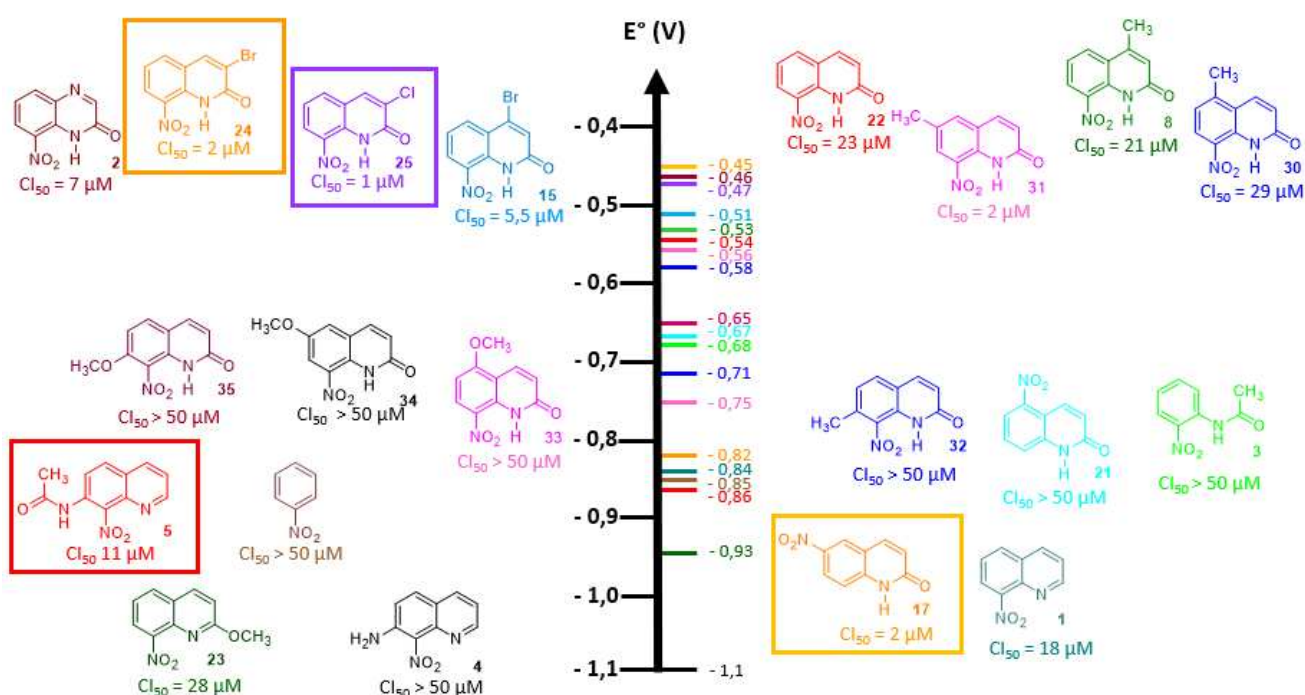
On observe ainsi qu'il existe un lien entre les activités antileishmaniennes et les potentiels de réduction des molécules de cette série. En effet, une limite de potentiel aux alentours de - 0,58 V semble séparer les molécules actives (valeurs  $\geq$  - 0,58 V) des molécules (valeurs  $\leq$  - 0,58 V) inactives sur la forme amastigote axénique de *L. infantum*. Il est alors possible de penser que la nitroréductase de *Leishmania* ne serait capable de bioactiver les molécules de cette série que si celles-ci ont des potentiels de réduction supérieurs ou égaux à - 0,58 V. Par ailleurs, les molécules les plus actives possèdent un potentiel de réduction compris entre - 0,45 et - 0,55 V (molécule **2**, **8** et **15** par exemple), ce qui nous indique une zone de potentiel intéressante afin de synthétiser des futurs dérivés aux propriétés antileishmaniennes, l'objectif étant de synthétiser des dérivés actifs avec le plus faible potentiel de réduction possible. En effet, un potentiel de réduction plus bas limite le caractère mutagène potentiel de ces molécules *via* une réduction du groupement nitro moins favorable, notamment par les nitroréductases bactériennes de *Salmonella typhimurim* utilisées dans le test d'Ames.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'existence éventuelle d'un lien entre l'activité antiparasitaire et le coefficient de partage (logP) de ces dérivés. Les clogP des molécules de cette série sont compris entre 1,15 et 2,5 (Tableau 13, page 117). Il apparaît qu'il n'y pas de relation évidente entre les logP calculés et les activités antileishmaniennes, on retrouve ainsi des molécules actives présentant de faibles clogP (molécule **2**) ou des clogP plus élevés (molécule **15**). Par ailleurs, les molécules **30** et **34** ont

le même potentiel de réduction de - 0,58 V, mais la première à une  $CI_{50}$  de 25  $\mu M$  tandis que la seconde est inactive ( $CI_{50} > 100 \mu M$ ). La différence pourrait provenir du logP qui est de 2,05 pour la molécule **30** et de 1,38 pour la molécule **34**. Il est donc possible qu'au-delà de l'influence des potentiels de réduction, la lipophilie des molécules de cette série impacte aussi en partie l'activité antileishmanienne.

#### 4.4.2. Relation entre l'activité anti-*Trypanosoma* et les potentiels de réduction.

Dans l'hypothèse d'une bioactivation par la nitroréductase de *Trypanosoma*, il semble que dans cette série chimique, cette enzyme soit capable de réduire des molécules dont le potentiel de réduction peut varier entre - 0,93 V (molécule **23**) et - 0,45 V (molécule **24**) comme présenté dans la figure 76.

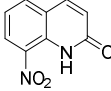
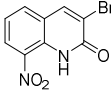


**Figure 76 :** Etude du lien entre l'activité anti-*Trypanosoma* sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei* et les potentiels de réductions.

En effet, les molécules actives présentent des potentiels de réduction élevés comme les molécules **24** et **25** (- 0,45 et - 0,47 V) aussi bien que des potentiels de réduction bas comme les molécules **5** et **17** (- 0,86 et - 0,82 V). Il n'existe pas non plus de lien entre les activités anti-*Trypanosoma* et les cLogP (Tableau 13), des molécules lipophiles comme la molécule **15** ( $CI_{50}$  de 1,9  $\mu M$  et logP de 2,36) ou moins lipophiles comme la molécule **17** ( $CI_{50}$  de 2  $\mu M$  et logP de 1,54) sont actives sur ce même parasite.

#### 4.5.Bilan des RSA

A la suite de ces différents résultats d'activité biologique, la molécule **24** a été choisie comme nouveau hit antikinétoplastidés avec des  $CI_{50}$  sur *Leishmania infantum* et *Trypanosoma brucei brucei* respectivement de 7,1  $\mu$ M et 1,9  $\mu$ M. Son profil d'activité biologique *in vitro* est résumé dans le tableau 18 et comparé avec celui du hit initial **22** et des molécules antileishmaniennes et anti-*Trypanosoma* de référence.

N°	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. ( $\mu$ M)	IS CC <sub>50</sub> HepG2/ CI <sub>50</sub> / <i>L. inf.</i>	IS CC <sub>50</sub> HepG2/ CI <sub>50</sub> / <i>T. b. brucei</i>
<b>22</b>		164 $\pm$ 28	15,5 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 5,7	10,6	7
<b>24</b>		<b>92 <math>\pm</math> 13</b>	<b>7,1 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>1,9 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>13</b>	<b>48,4</b>
	Amphotéricine B	5,5 $\pm$ 0,25	0,06 $\pm$ 0,001	-	92	-
	Mitléfosine	85 $\pm$ 8,8	0,8 $\pm$ 0,02	-	106	-
	Fexinidazole	> 200	3,4 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,2	> 59	> 500
	Suramine	> 100	-	0,02 $\pm$ 0,009	-	>5000
	Eflornithine	> 100	-	15,8 $\pm$ 2,1	-	> 6

**Tableau 18 :** Profil d'activité biologique du pharmacophore, du nouveau hit antikinétoplastidés, du fexinidazole et des substances actives de référence.

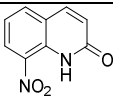
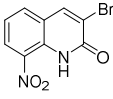
Ces résultats sont intéressants par rapport aux critères qui définissent ce qu'est un hit anti-kinétoplastidés.<sup>326,327</sup> Pour mémoire, les principaux critères incluent notamment une  $CI_{50}$  inférieure à 10  $\mu$ M sur la forme trypomastigote de *T. brucei brucei* tout comme sur la forme amastigote intramacrophagique de *Leishmania* ainsi qu'un index de sélectivité supérieur à 10 par rapport à une lignée humaine. Par ailleurs, cette molécule **24** est synthétisée en moins de 5 étapes et possède une solubilité en milieu biologique suffisante tout comme une pureté nettement supérieure à 90%. De plus, des études préliminaires de RSA ont été déjà réalisées sur ce pharmacophore, un autre critère de définition d'un hit anti-kinétoplastidés.

Pour compléter ces premiers résultats d'activité biologique, il nous restait à évaluer ce nouveau hit antikinétoplastidés sur la forme intramacrophagique de *Leishmania*. Ce test *in vitro* est le modèle le plus

<sup>326</sup> S. Nwaka, B. Ramirez, R. Brun *et al.*, *Plos. Negl. Dis.* **2009**, 3, e440

<sup>327</sup> K. Katsuno, J. N. Burrows, K. Duncan *et al.*, *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2015**, 14, 751-758

représentatif de la physiopathologie de la leishmaniose viscérale chez l'homme, il permet notamment de savoir si la molécule testée parvient à traverser la membrane du macrophage pour exercer son activité leishmanicide. Il a été réalisé sur *Leishmania donovani*, une autre espèce responsable de la leishmaniose viscérale. Par ailleurs, lors d'un test sur la forme amastigote intramacrophagique, il est important de savoir si l'activité antileishmanienne est spécifique où si elle est due à une cytotoxicité sur les macrophages. Pour cela, un test de cytotoxicité sur la lignée de macrophages utilisée lors de ce test (lignée THP-1) a été effectué.

N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> pro. (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> ama. intraM. (μM)	CC <sub>50</sub> THP1 (μM)
22		6,6 ± 0,3	6,5 ± 0,7	105 ± 12
24		5,9 ± 0,12	18 ± 2	72 ± 6
	Amphotéricine B	0,1 ± 0,25	0,4 ± 0,05	31,4 ± 3,7
	Miltéfosine	3,1 ± 0,06	4,3 ± 0,8	21,9 ± 4,8
	Fexinidazole	1,2 ± 0,28	>50	>62,5

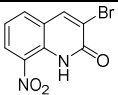
**Tableau 19 :** Activités antileishmaniennes des molécules **22** et **24** sur les deux formes de *L. donovani* et cytotoxicité sur une lignée de macrophages.

Le nouveau hit antikinétoplastidés **24** est aussi actif sur la forme promastigote de *Leishmania donovani* que le hit antileishmanien **22**, cependant il est 3 fois moins actif sur la forme amastigote intramacrophagique. Ainsi, ce nouveau hit antikinétoplastidés, substitué en position 3 par un atome de brome, est donc un bon substrat pour des études de RSA anti-*Trypanosoma*. De plus, avec une CI<sub>50</sub> de 1,9 μM sur *Trypanosoma brucei brucei*, cette molécule demeure très intéressante comme hit antiparasitaire. Si sur la forme promastigote de *L. donovani*, la molécule **24** est moins active que le fexinidazole et l'amphotéricine B de facteurs 5 et 60, elle présente le même niveau d'activité que la miltéfosine. Sur la forme amastigote, la molécule **24** est moins active que l'amphotéricine B et la miltéfosine mais plus active que le fexinidazole qui a une CI<sub>50</sub> > 50 μM sur cette forme du parasite.

## 5. Recherche du mécanisme d'action antiparasitaire.

### 5.1. Evaluation biologique sur des souches de *L. donovani* qui surexpriment les nitroreductases de *Leishmania* (NTR1 et NTR2).

Jusqu'à présent, nous n'avons fait qu'émettre l'hypothèse de la potentielle bioactivation des 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones par les nitroréductases parasitaires, au regard de leur structure nitroaromatique. Afin d'évaluer si le hit antikinétoplastidés **24** est un substrat d'une des deux nitroréductases leishmaniennes, les  $CI_{50}$  de cette molécule ont été déterminées sur des souches de *L. donovani* sauvages ou sur des souches qui surexpriment soit la NTR1 soit la NTR2, les deux nitroréductases présentes chez ce parasite.

N°	Structure	$CI_{50}$ <i>L. dono.</i> promastigote sauvage ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ <i>L. dono.</i> promastigote NTR1 <sup>SE</sup> ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ <i>L. dono.</i> promastigote NTR2 <sup>SE</sup> ( $\mu$ M)
<b>24</b>		$5,9 \pm 0,12$	$0,47 \pm 0,02$	$4,6 \pm 0,12$
	Féxinidazole	$7,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,01$	$4,6 \pm 0,03$

**Tableau 20 :** Activités biologiques du hit **24** sur des souches sauvages de *L. donovani* ou sur des souches surexprimant la NTR1 ou la NTR2.<sup>279,283</sup>

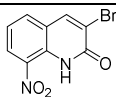
Nous pouvons donc constater que la molécule **24** est environ 12 fois plus active sur la souche qui surexprime la NTR1 que sur la souche sauvage, ce qui est une preuve indirecte de la bioactivation de cette molécule par la nitroréductase leishmanienne de type I. De plus cette même différence n'est pas observée sur la souche qui surexprime la NTR2, démontrant que la molécule **24** est sélectivement bioactivée par la NTR1. Par comparaison, le fexinidazole est un 5-nitroimidazole connu pour être bioactivé par la NTR1, son activité est augmentée d'un facteur 18 sur la souche qui la surexprime.

<sup>279</sup> S. Wyllie, S. Patterson et A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 901-906.

<sup>283</sup> S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval *et al.*, *PLoS Pathog.*, **2016**, 12, e1005971.

## 5.2. Evaluation biologique sur des souches de *T. b. brucei* qui surexpriment la nitroréductase de *Trypanosoma* (NTR1)

Ces mêmes tests ont été effectués sur une première souche de *Trypanosoma brucei brucei* sauvage et sur une seconde souche qui surexprime la seule nitroréductase présente chez ce parasite, une NTR de type I (Tableau 21).

N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. sauvage (μM)	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. NTR <sup>SE</sup> (μM)
24		17,7 ± 1,0	3,9 ± 0,1
	Nifurtimox	1,87 ± 0,05	0,6 ± 0,05

**Tableau 21 :** Tests d'activités biologiques sur une souche sauvage de *T. brucei brucei* et sur une souche surexprimant la NTR de type I.

Nous pouvons constater que la molécule **24** est bien un substrat de la NTR de *Trypanosoma brucei brucei* avec une activité augmentée d'un facteur 4,5 sur la souche qui surexprime cette NTR, en comparaison avec la souche sauvage.

La molécule **24** est donc un nouveau hit antikinétoplastidé, actif à la fois sur *Leishmania infantum* et sur *Trypanosoma brucei brucei* avec des CI<sub>50</sub> respectives de 7,1 μM et 1,9 μM. Son mécanisme d'action impliquerait donc les nitroréductases de type I de ces deux parasites qui métaboliseraient cette molécule en des dérivés cytotoxiques. En vue d'étudier le potentiel pharmaceutique de cette molécule-hit, des études de pharmacocinétiques *in vitro*, tout comme des tests de mutagénicité et de génotoxicité, ont été réalisés.

## 6. Etudes *in vitro* du potentiel pharmaceutique de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

### 6.1. Evaluation de la mutagénicité et de la génotoxicité.

Comme décrit dans le chapitre 2, les molécules possédant un groupement nitroaromatique sont souvent suspectées d'être mutagènes ou génotoxiques ce qui a limité leur développement industriel ces dernières années. Le test d'Ames a ainsi été effectué sur la molécule **24**, dans des conditions métabolisantes, et les résultats sont présentés dans le tableau 22.

	0,25 mM	2,5 mM
TA97a +S9-mix	Positif	Positif
TA98 +S9-mix	Positif	Positif
TA100 +S9-mix	Positif	Positif
TA102 +S9-mix	Négatif	Positif

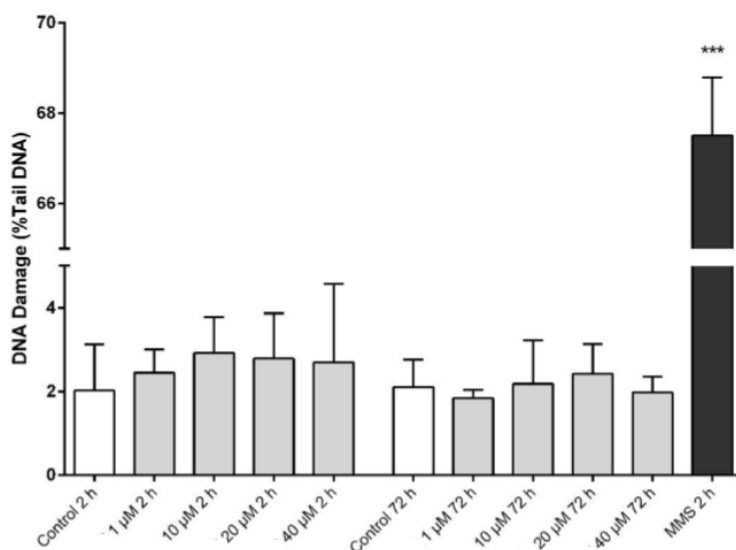
**Tableau 22 :** Evaluation de la génotoxicité à deux concentrations de la molécule **24** sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* en présence de S9-mix.

Les résultats de ce test d'Ames indiquent que la molécule **24** (et/ou certains de ses métabolites) est globalement mutagène, induisant des mutations sur les différentes souches aux différentes concentrations testées. Cependant, les souches de *Salmonella typhimurium* possèdent des nitroréductases connues pour bioactiver des molécules possédant un groupement nitroaromatique comme le métronidazole. Il est donc nécessaire d'évaluer ce dérivé nitré *via* un test qui est réalisée sur une lignée humaine n'exprimant pas de nitroréductases, comme le test des comètes ou le test du micro-noyau.

Le test des comètes a été réalisé selon un protocole récemment décrit par E. Boutet et coll.<sup>354</sup> Des cellules HepG2, incubées avec la molécule **24** pendant 2 ou 72 h, ont été incorporées à un gel d'agarose et déposées sous forme de mini dépôts sur des morceaux de film de polyester Gelbond® pré-découpés. Afin de lyser les cellules et de libérer leurs noyaux, ces films ont été placés dans une solution de lyse composées de NaCl, de Na<sub>2</sub>EDTA, de Triton et de tampon Tris pendant 18 h, afin de détruire les membranes cellulaires, les ARN et les protéines. Les films de polyester sont ensuite placés dans un bain électrophorétique basique, afin de faciliter la dénaturation des noyaux d'ADN. Ces noyaux vont alors migrer. Ces films sont finalement neutralisés, fixés à l'éthanol et colorés avec du SYBR® Gold, un intercalant fluorescent. Ils sont ensuite analysés à l'aide d'un microscope à fluorescence et des images de chaque dépôt réalisé sont prises grâce à une caméra. Ces images sont ensuite analysées *via* un logiciel « Lucia ». Lors de ce test, le méthane sulfonate de méthyle (MMS) est utilisé comme contrôle positif. Cet ester sulfonique est un agent alkylant de l'ADN. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 77). Le contrôle négatif contient une solution de DMSO à 0,05% dans du milieu biologique. Lors de ce test, on différencie le % d'ADN présent dans le noyau avec celui présent dans la queue de la comète, synonyme de génotoxicité. Plus le % d'ADN présent dans la queue sera élevé et plus la molécule aura un effet génotoxique marqué.

<sup>354</sup> H. Perdry, K. B. Gutzkow, M. Chevalier *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **2018**, DOI : 10.1002/em.22204.





**Figure 77 :** Résultat du test des comètes effectué sur la molécule **24**, à 1 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM et à t= 2 h et 72 h.

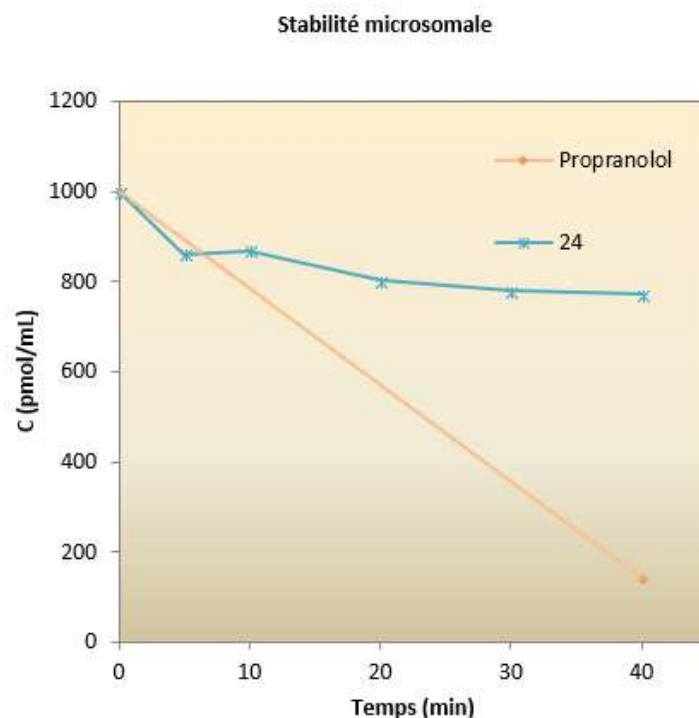
Sur cette figure, aucune augmentation du pourcentage d'ADN présent dans la queue n'a été constaté aux concentrations testées de 1 µM, 10 µM, 20 µM et 40 µM à des temps d'incubation de 2 h et 72 h, en comparaison avec le contrôle négatif. Par ailleurs, ces pourcentages d'ADN sont très significativement inférieurs à celui du contrôle positif à 1 mM (MMS). Nous pouvons donc en conclure que la molécule **24** n'est pas génotoxique aux concentrations testées de 1 µM, 10 µM, 20 µM et 40 µM, concentrations auxquelles la molécule est peu cytotoxique. Le dérivé **24** n'est pas génotoxique après 2 h et 72 h d'incubation. Après 72 h, les cellules sont capables d'identifier et de corriger des dommages causés sur l'ADN qui pourraient résulter en des faux négatifs. C'est pour cela qu'un second temps, plus court, a été choisi lors de ce test.

## 6.2. Etudes pharmacocinétiques *in vitro*.

### 6.2.1. Stabilité microsomale

A la suite de ce résultat encourageant, en vue d'un futur développement de ce pharmacophore, nous avons voulu approfondir les études *via* les données de pharmacocinétique *in vitro* de stabilité en présence de microsomes hépatiques et de test de fixation aux protéines plasmatiques.

L'évaluation de la stabilité microsomale est un paramètre important donnant des informations sur le métabolisme de la molécule testée. Ce test consiste en l'incubation du produit avec des microsomes de souris comprenant tout un arsenal d'enzymes à même de métaboliser le composé testé tels que les cytochromes P450, des monooxygénases à flavine ou encore diverses transférases. Le suivi est réalisé par LC-MS et les résultats donnés sous forme de demi-vie exprimée en minutes (Figure 78).



**Figure 78 :** Représentation graphique de la stabilité microsomale de la molécule **24**.

La molécule **24** est donc une molécule stable en présence de microsomes hépatiques avec une demi-vie supérieure à 40 min (et une métabolisation inférieure à 20% au bout de ce même temps). Par comparaison, le propranolol qui est utilisé comme contrôle positif est métabolisé à plus de 80% après 40 min dans les mêmes conditions expérimentales.

### 6.2.2. Fixation à l'albumine.

La fixation aux protéines plasmatiques est un autre paramètre important en vue d'une utilisation *in vivo*. En effet, une fois que la molécule atteint la circulation sanguine, elle peut se lier avec les protéines plasmatiques comme l'albumine ou les gammaglobulines présentes en grande quantité pour former des complexes molécule-protéine. Or, seule la fraction libre pourra exercer son activité biologique. Ainsi, si la molécule **24** est fixée en proportion trop importante à ces protéines plasmatiques, son activité antikinétoplastidés pourrait être réduite. Il existe cependant des exceptions à cette règle comme les molécules qui se lient à leur cible pharmacologique de façon covalente : l'équilibre entre la fraction libre de la molécule et la fraction liée aux protéines plasmatiques est ainsi déplacé au fur et à mesure que la molécule se lie avec sa cible.<sup>355</sup> Un test *in vitro* de fixation à l'albumine a ainsi été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille afin d'évaluer ce paramètre pour la molécule **24**. Les contrôles utilisés dans ce test sont le diclofénac, l'oxazépam, la carbamazépine et la warfarine.

<sup>355</sup> D. A. Smith, L. Di et E. H. Kerns, *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2010**, 9, 929-939.

Les résultats sont présentés dans la figure 79. La molécule **24** possède un taux de fixation à l'albumine humaine de 92% soit une assez forte affinité.

Ainsi, avec une bonne stabilité microsomale et un pourcentage de fixation à l'albumine de 92%, la molécule **24** semble à priori être une molécule adaptée pour une future évaluation biologique *in vivo*.

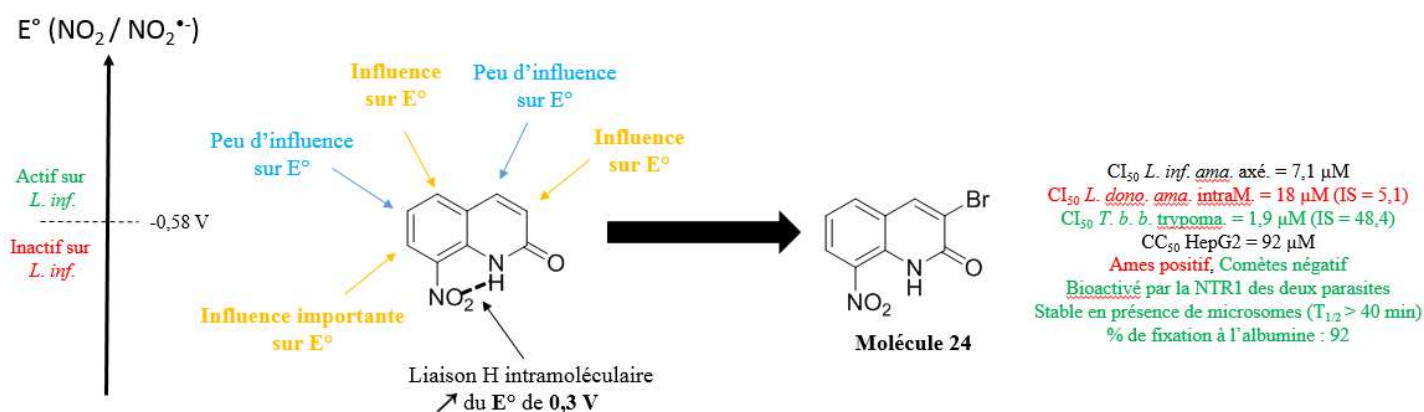
	Buffer chamber	Plasma chamber	% Bound			$f_u$			Log $f_u$
Compound ID	$A_{\text{analyte}}/A_{\text{IS}}$	$A_{\text{analyte}}/A_{\text{IS}}$	Value	Average	sd	Value	Average	sd	Value
Carbamazepine	3,721	13,828	73,1	72,4	0,6	0,269	0,276	0,0060	-0,560
	3,858	13,913	72,3			0,277			
	3,932	14,010	71,9			0,281			
<b>24</b>	0,091	1,178	92,3	92,2	0,1	0,077	0,078	0,0009	-1,110
	0,091	1,182	92,3			0,077			
	0,093	1,187	92,1			0,079			
Oxazepam	0,116	1,864	93,8	94,1	0,4	0,062	0,059	0,0038	-1,226
	0,112	1,846	93,9			0,061			
	0,101	1,825	94,5			0,055			
Warfarin	0,097	11,234	99,14	99,16	0,02	0,009	0,008	0,0002	-2,074
	0,096	11,518	99,17			0,008			
	0,093	11,098	99,16			0,008			
Diclofenac	0,002	0,845	99,75	99,76	0,03	0,002	0,002	0,0003	-2,614
	0,002	0,856	99,79			0,002			
	0,002	0,870	99,73			0,003			

Figure 79 : Résultats du test de fixation à l'albumine de la molécule **24**.

## 7. Conclusion.

En partant d'un pharmacophore antileishmanien en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones, 35 molécules ont été synthétisées dans le but de :

- Poursuivre l'étude du pharmacophore tout en essayant d'améliorer l'hydrosolubilité et l'activité antileishmanienne de ces dérivés
- Etudier le lien entre les potentiels de réduction et les activités antiparasitaires des molécules de cette série.
- Evaluer leur activité biologique sur un autre parasite de la famille des *Trypanosomatidae*.
- Evaluer la génotoxicité tout comme des paramètres pharmacocinétiques *in vitro* afin de statuer sur le potentiel thérapeutique de cette série de molécules.



**Figure 80 :** Etude des potentiels de réduction de dérivés en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones et profil biologique de la molécule **24**, nouveau hit antikinétoplastidés.

Cette étude<sup>356</sup> a permis d'observer que l'introduction d'un substituant sur la partie pyridone du pharmacophore semble avoir moins d'effet sur le potentiel de réduction lorsqu'elle est réalisée en position 4 qu'en position 3. Sur la partie benzénique du pharmacophore, la présence d'un groupement méthyle ou méthoxy en position 6 a peu d'effet sur le potentiel de réduction. Néanmoins, lorsque ces groupements sont présents en position 5 et 7 du pharmacophore, les potentiels de réduction sont significativement diminués. Des études de diffraction aux rayons X ont révélé l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène du motif lactame et l'oxygène du groupement nitro qui augmente le potentiel de réduction des molécules de cette série de 0,3 V, en appauvrissant le cycle nitroaromatique en électrons.

Par ailleurs, il semblerait que pour conserver une activité antileishmanienne, les molécules de cette série doivent posséder un potentiel de réduction compris entre - 0,45 et - 0,58 V. L'introduction d'un atome de brome en position 3 du pharmacophore a permis l'identification d'un nouveau hit, actif à la fois sur la forme promastigote de *Leishmania donovani*, la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*, avec des  $CI_{50}$  respectives de 4,6  $\mu$ M, 7,1  $\mu$ M et 1,9  $\mu$ M. Cette molécule est peu cytotoxique sur la lignée humaine HepG2 avec une  $CC_{50}$  de 92  $\mu$ M.

De plus, nous avons démontré pour la première fois que la molécule **24** était bioactivée par la NTR1 de *Leishmania donovani* et la NTR de *Trypanosoma brucei brucei*, signifiant que son mécanisme d'action impliquerait la formation de métabolites tels que le dérivé nitroso ou le dérivé hydroxylamine, ces dérivés menant à la mort de ces parasites.

Par ailleurs, la molécule **24** bien que positive au test d'Ames, est négative au test des comètes. Elle est stable en présence de microsomes hépatiques avec un  $T_{1/2}$  supérieur à 40 minutes et se fixe à hauteur

<sup>356</sup> J. Pedron, C. Boudot, S. Hutter *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 155, 135-152.

de 92% sur l'albumine. Cette étude ouvre donc la voie à une conception rationnelle de nouvelles molécules antiparasitaires, actives et sélectives, bioactivées par des nitroréductases parasitaires. Des études de pharmacomodulation antiparasitaire axées sur les positions 3 et 6 du pharmacophore seront ainsi développées dans les chapitres 4 et 5.

Cette molécule répond à une majorité des critères présents dans la littérature qui définissent ce qu'est un bon hit anti-infectieux, plus particulièrement pour son activité anti-*Trypanosoma*. En effet, le seuil d'activité indiqué est d'une  $CI_{50}$  inférieure à 10  $\mu M$  sur la forme trypomastigote de *T. brucei* et sur la forme amastigote intramacrophagique de *Leishmania*. Or si sa  $CI_{50}$  est de 1,9  $\mu M$  sur *T. brucei*, elle est de 18 sur la forme amastigote intramacrophagique de *Leishmania donovani*. Pour compléter ce travail et remplir les derniers critères qui définissent un bon hit, des tests *in vitro* sont à réaliser sur des souches résistantes aux médicaments sur le marché ou au fexinidazole tout comme un second test de stabilité microsomale sur une autre lignée, de préférence humaine.

## PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 3

### 1. Méthodes Générales.

#### 1.1. Chromatographie sur couche mince.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur gel de silice avec indicateur de fluorescence F254, déposé sur feuille d'aluminium (Alugram® - Macherey-Nagel). La révélation de ces plaques CCM a été effectuée sous une lampe à ultraviolets à une longueur d'onde de 254 nm.

#### 1.2. Point de fusion.

Les points de fusion des produits cristallisés ont été mesurés en tubes capillaires sur un appareil Stuart, (Melting Point SMP3) du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse et n'ont pas été corrigés.

#### 1.3. Spectrométrie par RMN.

Les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur des appareils Bruker IconNMR 400 MHz, Bruker UltraShield 300 MHz et Bruker 400HD au service RMN du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS), pris comme référence interne et les constantes de couplages sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux de résonance est indiquée par les abréviations : (s) singulet, (sl) singulet large (d) doublet, (dd) doublet de doublet, (t) triplet, (td) triplet de doublet, (q) quadruplet et (m) multiplet.

#### 1.4. Spectrométrie de masse à haute résolution.

Les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution ont été réalisées au service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie de Toulouse, à l'Université Paul Sabatier. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre de masse GCT Premier (DCI,  $\text{CH}_4$ , HRMS) ou Xevo G2 QTOF (Waters,  $\text{ESI}^+$ , HRMS)

#### 1.5. Micro-ondes.

Les réactions micro-onde ont été réalisées dans un micro-onde CEM Discover® du Laboratoire de Chimie de Coordination.

#### 1.6. Diffraction des rayons X.

Les mesures de diffraction des rayons X ont été réalisées au service de diffraction des rayons X du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse. Les analyses ont été effectuées sur un diffractomètre Bruker APEX II ou Gemini Agilent à 100 °K. Les structures ont été résolues à l'aide du programme SIR92 et ajustées grâce au programme CRYSTALS.

### 1.7. Mesure des potentiels de réduction.

Les mesures de potentiels de réduction par voltampérométrie cyclique ont été effectuées au service d'électrochimie du Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse. Elles ont été réalisées par un potentiostat Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) et contrôlées par le logiciel GPES 4.09. Les mesures ont été effectuées à température ambiante, dans une cellule hermétique à 3 électrodes connectée à une ligne de vide/Argon. L'électrode de référence utilisée a été une électrode saturée au calomel (ECS) séparée de la solution par un compartiment pontant. La contre-électrode a été une électrode de platine avec une surface apparente de 1 cm<sup>2</sup>. L'électrode de travail a été une électrode de carbone vitreux de 1,0 mm de diamètre (Bio-logic SAS). L'électrolyte (nBu<sub>4</sub>N)[PF<sub>6</sub>] (Fluka, 99% de pureté) et le DMSO (Sigma-Aldrich, séché < 0,02 % d'eau) ont été utilisés tels quels et simplement dégazés sous Argon. Les solutions utilisées pendant les études électrochimiques ont été composées de 10<sup>-3</sup> mol/L de composés testés et de 0,1 mol/L d'électrolyte. Avant chaque mesure, les solutions ont été dégazées en faisant buller de l'Argon et l'électrode de travail a été polie sur une machine à polir (Presi P230). Dans ces conditions expérimentales, le potentiel de demi-vague (E<sub>1/2</sub>) du ferrocène (correspondant au couple redox Fc<sup>+</sup>/Fc) a été déterminé à - 0,45 V par rapport à l'ECS. Les potentiels de pic expérimentaux ont été mesurés par rapport à l'ECS et convertis par rapport à l'ENH en ajout 0,241V.

## 2. Partie Chimie

### Préparation de la 8-nitroquinoléine **1**.<sup>328</sup>

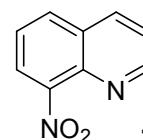
Selon un protocole préalablement décrit, 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) ont été ajoutés sur 1 g de quinoléine (7,75 mmol, 1 équiv.) dans un ballon bicol de 50 mL refroidi par un bain de glace. Une solution de 2,6 mL de HNO<sub>3</sub> à 65% (39 mmol, 5 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 1 h. Le milieu réactionnel a été successivement versé dans de l'eau, alcalinisé par de la soude et extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 50 mL). La phase organique résultante a ensuite été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **1** a été isolé sous forme de poudre jaune pâle avec un rendement de 35% (2,7 mmol, 470 mg).

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Apparence : Poudre jaune pâle

Point de fusion : 90 °C (Lit : 90°C)<sup>328</sup>.

Masse Molaire : 174,16 g/mol.



<sup>328</sup> F. Misani et N. T. Bogert, *J. Org. Chem.*, **1945**, 10, 458-463.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,53-7,66 (m, 2 H) ; 8,04 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2 H) ; 8,27 (dd,  $J = 1,6$  et 8,4 Hz, 1 H, H7) ; 9,70 (dd,  $J = 1,7$  et 4,2 Hz, 1 H, H2). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122,8 (CH) ; 123,8 (CH) ; 125,3 (CH) ; 129,0 (C) ; 132,0 (CH) ; 136,1 (CH) ; 139,5 (C) ; 148,2 (C) ; 152,6 (CH).

### Préparation de la 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one **2**

Dans un ballon bicol de 50 mL, 25 mL d'éthanol ont été ajoutés sur 1 g de 3-nitro-1,2-phénylènediamine (6,53 mmol, 1 équiv.). De l'acide glyoxylique monohydraté (0,6 g, 6,53 mmol, 1 équiv.) a ensuite été ajouté à t.a. et le milieu réactionnel a été agité à 80°C pendant 6 h. Le milieu réactionnel a été versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a ensuite été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant un mélange dichlorométhane/éther diéthylique (80/20) comme éluant. Le composé **2** a été isolé sous forme de poudre orange avec un rendement de 46% (2,98 mmol, 570 mg).

Formule brute :  $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3$

Apparence : Poudre orange

Point de fusion : 162 °C.

Masse Molaire : 191,15 g/mol.

HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  192.0409, trouvée 192.0412.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,45-7,50 (m, 1 H, H6) ; 8,25 (dd,  $J = 1,5$  et 8,2 Hz, 1 H, H5) ; 8,39 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, H3) ; 8,55 (dd,  $J = 1,5$  et 8,2 Hz, 1 H, H7) ; 11,37 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122,6 (CH) ; 127,8 (C) ; 128,0 (CH) ; 133,1 (C) ; 133,8 (C) ; 137,4 (CH) ; 152,6 (CH) ; 153,6 (C).



### Préparation du *N*-(2-Nitrophényl)-acétamide **3**<sup>330</sup>

Selon un protocole préalablement décrit, 25 mL d'acide acétique ont été ajoutés sur 525 mg de 2-nitroaniline (3,8 mmol, 1 équiv.) dans un ballon bicol de 50 mL. Le milieu réactionnel a ensuite été agité à 120 °C et 720  $\mu\text{L}$  d'anhydride acétique (7,6 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Après 3 h à reflux, le milieu réactionnel a été versé dans un bain de glace, alcalinisé avec du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **3** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 87 % (3,3 mmol, 604 mg).

<sup>330</sup> V. V. Patil et G. S. Skangarling, *J. Org. Chem.*, **2015**, 80, 7876-7883.

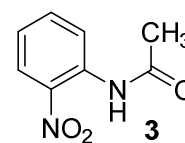
Formule brute :  $C_8H_8N_2O_3$

Apparence : Poudre orange

Point de fusion : 93 °C (Lit : 92-94 °C).<sup>330</sup>

Masse Molaire : 180,16 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,29 (s, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,16-7,20 (m, 1 H, H4) ; 7,63-7,67 (m, 1 H, H5) ; 8,21 (dd,  $J = 8,5$  et 1,3 Hz, 1 H, H6) ; 8,77 (dd,  $J = 8,6$  et 1,3 Hz, 1 H, H3) ; 10,33 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 25,60 ( $CH_3$ ) ; 122,2 (CH) ; 123,2 (CH) ; 125,7 (CH) ; 134,8 (C) ; 135,9 (CH) ; 136,3 (C) ; 169,0 (C).



### Préparation de la 7-amino-8-nitroquinoléine 4<sup>357</sup>

Selon un protocole préalablement décrit, 20 mL de  $H_2SO_4$  (98%) ont été ajoutés sur 100 mg de 7-aminoquinoléine (0,70 mmol, 1 équiv.) dans un ballon bicol de 50 mL refroidi à l'aide d'un bain de glace. Une solution de  $HNO_3$  à 65% (35  $\mu L$ , 0,35 mmol, 0,5 équiv.) a ensuite été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 4 h. Le milieu réactionnel a été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé avec du  $K_2CO_3$  et extrait 3 fois avec du dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (80/20). Le composé 4 a été isolé sous la forme d'une poudre orange avec un rendement de 46% (0,16 mmol, 30 mg).

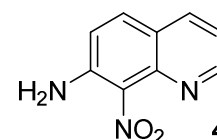
Formule brute :  $C_9H_7N_3O_2$

Apparence : Poudre orange

Point de fusion : 193 °C (Lit : 194 °C).

Masse Molaire : 189,17 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5,61 (sl, 2 H,  $NH_2$ ) ; 7,00 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1 H, H6) ; 7,28 (dd, 1 H,  $J = 4,4$  et 8,1 Hz, H3) ; 7,69 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, H5) ; 8,00 (dd, 1 H,  $J = 1,8$  et 8,1 Hz, H4) ; 8,92 (dd, 1 H,  $J = 1,8$  et 4,4 Hz, H2). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, Acétone  $d_6$ ): 118,9 (CH) ; 119,8 (CH) ; 120,9 (C) ; 131,8 (CH) ; 135,7 (CH) ; 139,7 (C) ; 142,8 (C) ; 143,1 (C) ; 151,2 (CH).



<sup>357</sup> I. G. Moores, R. K. Smalley, H. Suschitzky, *J. Fluorine. Chem.*, **1982**, 20, 573-580.

**Préparation de la 7-acétylamino-8-nitroquinoléine 5**

Dans un ballon bicol de 50 mL, 20 mL d'acide acétique ont été ajoutés sur 60 mg de 7-amino-8-nitroquinoléine 4 (0,32 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été agité à 120°C et 180  $\mu$ L d'anhydride acétique (1,6 mmol, 6 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Après 24 h à reflux, le milieu réactionnel a été versé dans un bain de glace, alcalinisé avec du  $K_2CO_3$  et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (90/10). Le composé **5** a été isolé et recristallisé dans l'isopropanol sous forme de poudre jaune avec un rendement de 53% (0,17 mmol, 39 mg).

Formule brute :  $C_{11}H_9N_3O_2$

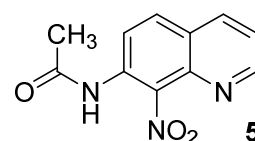
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 189 °C.

Masse Molaire : 231,21 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_{11}H_{10}N_3O_2$   $[M+H]^+$  232.0722, trouvée 232.0719.

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,28 (s, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,49 (dd,  $J = 4,3$  et  $8,3$  Hz, 1 H, H3) ; 7,96 (d, 1H,  $J = 9,2$  Hz, H6) ; 8,19 (dd,  $J = 1,7$  et  $8,3$  Hz, 1 H, H4) ; 8,35 (sl, 1 H, NH) ; 8,54 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1 H, H5) ; 8,99 (dd,  $J = 1,7$  et  $4,3$  Hz, 1 H, H2). RMN  $^{13}C$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 25,0 ( $CH_3$ ) ; 121,7 (CH) ; 121,9 (CH) ; 125,2 (C) ; 127,8 (C) ; 131,4 (CH) ; 131,8 (C) ; 135,8 (CH) ; 140,3 (C) ; 152,6 (CH) ; 168,7 (C).

**Préparation de la 2-chloro-4-méthyl-8-nitroquinoléine 6 et de la 2-chloro-4-méthyl-6-nitroquinoléine 7<sup>331</sup>**

Selon un protocole préalablement décrit, 50 mL de  $H_2SO_4$  (98%) ont été ajoutés sur 5 g de 2-chloro-4-méthylquinoléine (28,1 mmol, 1 équiv.) dans un ballon bicol de 250 mL refroidi à l'aide d'un bain de glace. Une solution de 11.5 mL de  $HNO_3$  à 65% (169 mmol, 6 équiv.) a été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel a été ajouté à t.a. pendant 3 h. Le milieu réactionnel a été successivement versé dans un bécher d' $H_2O$ , alcalinisé avec du KOH et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 100 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (70/30). Les composé **6** et **7** ont été séparés, isolés et recristallisés dans l'isopropanol sous forme de poudres blanches avec des rendements respectifs de 53 % (14,8 mmol, 3,3 g) et 19% (5,3 mmol, 1,2 g).

<sup>331</sup> O. H. Johnson et C. S. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 2867-2869.

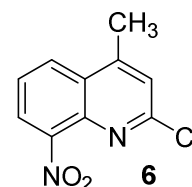
Formule brute :  $C_{10}H_7ClN_2O_2$

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 143 °C (Lit : 142-143 °C)<sup>358</sup>

Masse Molaire : 222,63 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,74 (d,  $J = 1,0$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,35 (d,  $J = 1,0$  Hz, 1 H, H3) ; 7,62-7,66 (m, 1 H, H6) ; 8,00 (dd,  $J = 7,6$  et 1,3 Hz, 1 H, H5) ; 8,18 (dd,  $J = 8,4$  et 1,3 Hz, 1 H, H7). RMN  $^{13}C$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 18,9 ( $CH_3$ ) ; 124,2 (CH) ; 124,5 (CH) ; 125,4 (CH) ; 127,8 (CH) ; 127,9 (C) ; 138,9 (C) ; 147,8 (C) ; 147,9 (C) ; 153,2 (C).



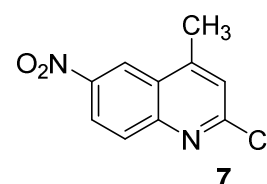
Formule brute :  $C_{10}H_7ClN_2O_2$

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 213 °C (Lit : 212-213 °C)<sup>331</sup>.

Masse Molaire : 222,63 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,82 (d,  $J = 1,0$  Hz, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,44 (d,  $J = 1,1$  Hz, 1 H, H3) ; 8,16 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1 H, H8) ; 8,52 (dd,  $J = 9,2$  et 2,5 Hz, 1 H, H7) ; 8,95 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1 H, H5). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 18,7 ( $CH_3$ ) ; 120,8 (CH) ; 123,9 (CH) ; 124,5 (CH) ; 126,2 (C) ; 130,9 (CH) ; 145,5 (C) ; 149,6 (C), 150,0 (C) ; 154,4 (C).



### Préparation de la 4-méthyl-8-nitroquinoléine-2(1H)-one **8**<sup>332</sup>

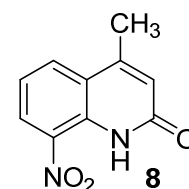
Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL d'acétonitrile et 25 mL d'acide perchlorique à 70 % a été ajouté sur 2,7 g de 2-chloro-4-méthyl-8-nitroquinoléine **6** (12 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a été agité à 100°C pendant 24 h. Le milieu réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, neutralisé avec de la potasse puis extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 50 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **8** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 92% (11 mmol, 2,2 g).

Formule brute :  $C_{10}H_8N_2O_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 203 °C (Lit : 196 °C).<sup>331</sup>

Masse Molaire : 204,18 g/mol.



<sup>358</sup> M. Ishikawa et I. Kikkawa, *Yakugaku Zasshi*, **1955**, 75, 36-39.

<sup>332</sup> V. Andreev et Y. P. Nizhnik, *Russian J. Org. Chem.* **2002**, 38, 137-138.

<sup>331</sup> O. H. Johnson et C. S. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 2867-2869.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3,33 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 6,63 (s, 1 H, H3) ; 7,39-7,44 (m, 1 H, H6) ; 8,19 (dd,  $J = 8,0$  et  $1,3$  Hz, 1H, H5) ; 8,42 (dd,  $J = 8,4$  et  $1,6$  Hz, 1 H, H7) ; 10,98 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$ : 19,6 ( $\text{CH}_3$ ) ; 121,6 (CH) ; 122,0 (CH) ; 122,6 (C) ; 127,9 (CH) ; 133,1 (CH) ; 133,6 (C) ; 134,6 (C) ; 148,9 (C) ; 161,0 (C).

### Préparation de la 4-bromométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **9**<sup>333</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 15 mL de tétrachlorure de carbone a été ajoutée sur 400 mg de 4-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **8** (1,9 mmol, 1 équiv.) et 1,7 g de *N*-bromosuccinimide (9,7 mmol, 5 équiv.). Le milieu réactionnel a été chauffé à 80°C avant que 31 mg de AIBN (0,24 mmol, 0,1 équiv.) soient ajoutés, et agité pendant 24 h. Le milieu réactionnel a ensuite été versé dans un bécher d'eau, extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 25 mL) et une fois à l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Le composé **8** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 21% (0,42 mmol, 120 mg).

Formule brute :  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_3$

Apparence : Poudre jaune.

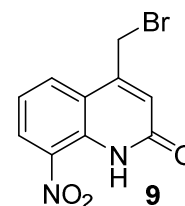
Point de fusion : 161 °C.

Masse Molaire : 283,08 g/mol.

HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  282,9718, trouvée 282,9723.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,60 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ) ; 6,87 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H3) ; 7,40-7,44 (m, 1 H, H6), 8,18 (dd,  $J = 1,3$  et  $8,8$  Hz, 1 H, H5) ; 8,57 (dd,  $J = 1,3$  et  $8,3$  Hz, 1 H, H7) ; 11,44 (sl, 1 H, NH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,)  $\delta$ : 27,9 ( $\text{CH}_2$ ) ; 120,2 (C) ; 121,3 (CH) ; 123,7 (CH) ; 128,4 (CH) ; 132,4 (CH) ; 133,6 (C) ; 134,4 (C) ; 146,1 (C) ; 160,7 (C).



### Préparation de la 4-hydroxyméthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **10**<sup>359</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 50 mL d'un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$  (50/50) ont été ajoutés sur 150 mg de 4-bromométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **9** (0,53 mmol, 1 équiv). De la soude (106 mg, 2,6 mmol, 5 équiv.) a alors été ajoutée et le mélange réactionnel a été agité à 50°C pendant 24 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bécher d'eau, extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 25 mL) et deux fois avec de l'acétate d'éthyle (2 fois 25 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Le composé **10** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 43% (0,23 mmol, 50 mg).

<sup>333</sup> K. C. Majumdar et N. Kundu, *Synth. Commun.* **2006**, 36, 1879-1886.

<sup>359</sup> K. Hiramitsu, Y. Morimoto, T. Baba, *et al.*, PCT **2014**, WO 2014-JP61004 A1.

Formule brute :  $C_{10}H_8N_2O_4$

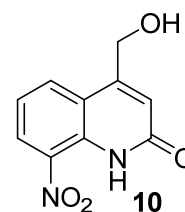
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 211 °C.

Masse Molaire : 220,18 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_{10}H_9N_2O_4$   $[M+H]^+$  221,0562, trouvée 221,0558.

RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4,80 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ) ; 5,67 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1 H, OH) ; 6,73 (s, 1 H, H3) ; 7,37-7,42 (m, 1 H, H6) ; 8,13 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1 H, H5) ; 8,42 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1 H, H7) ; 11,01 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 39,5 ( $CH_2$ ) ; 122,0 (CH) ; 122,1 (C) ; 123,0 (CH) ; 128,2 (CH) ; 133,3 (CH) ; 133,8 (CH) ; 136,5 (C) ; 141,3 (C) ; 161,6 (C).



### Préparation de la *N*-Boc- 2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine **11**<sup>334</sup>

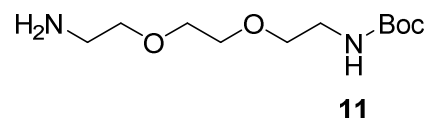
A un ballon bicol de 250 mL contenant 50 mL de chloroforme, 1,7 mL 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine (11,4 mmol, 1 équiv.) ont été ajoutés. Une solution de 10 mL de chloroforme contenant 0,5 g de  $Boc_2O$  (2,29 mmol, 0,2 équiv.) a ensuite été ajoutée au goutte à goutte et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 24 h. Le mélange réactionnel a alors été successivement lavé, séché sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20). Le composé **11** a été isolé sous forme d'huile jaunâtre avec un rendement de 52% (1,2 mmol, 300 mg).

Formule brute :  $C_{11}H_{24}N_2O_2$

Apparence : Huile jaunâtre.

Masse Molaire : 248,17 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1,37 (s, 9 H, t-Bu) ; 2,02 (sl, 2 H,  $NH_2$ ) ; 2,64 (t,  $J = 5,77$  Hz, 2 H) ; 3,05 (q,  $J = 5,98$  Hz, 2 H) ; 3,34-3,40 (m, 4 H) ; 3,49 (s, 4 H) ; 6,78 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 28,4 (3  $CH_3$ , t-Bu) ; 40,3 ( $CH_2$ ) ; 41,7 ( $CH_2$ ) ; 70,2 (3  $CH_2$ ) ; 73,3 ( $CH_2$ ) ; 79,2 (C) ; 156,0 (C).



### Préparation de la 4-[[2-(*N*-boc-2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl]aminométhyl-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **12**

Dans un ballon bicol de 250 mL, 50 mL de THF ont été ajoutés sur 500 mg de 4-bromométhyl-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **9** (1,8 mmol, 1 équiv.) et 1,3 g de *N*-Boc-2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine (5,3 mmol, 3 équiv.). De la triéthylamine (375  $\mu$ L, 2,7 mmol, 1,5 équiv.) a ensuite été ajoutée et le milieu réactionnel agité à 50°C pendant 24 h. Le milieu réactionnel a finalement été successivement évaporé sous pression réduite, re-solubilisé dans l'acétate d'éthyle, lavé trois fois, séché sur  $MgSO_4$  anhydre puis évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel

<sup>334</sup> M. A. Cinelli, B. Cordero, T. S. Dexheimer *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7145-7155.

de silice en éluant avec un mélange éther diéthylique/méthanol/ solution aqueuse d'ammoniaque à 20% (89/10/1). Le composé **12** a été isolé sous forme d'huile orange avec un rendement de 84% (1,5 mmol, 680 mg).

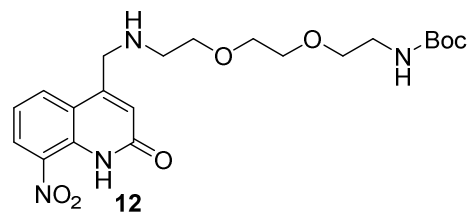
Formule brute :  $C_{21}H_{30}N_4O_7$

Apparence : Huile orange.

Masse Molaire : 450,49 g/mol.

HRMS (ESI) calculée pour  $C_{21}H_{31}N_4O_7$   $[M+H]^+$  450,2114, trouvée 450,2118.

RMN  $^1H$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1,36 (s, 9H, *t*Bu) ; 2,5 (s, 1 H, NH amine) ; 2,75-2,77 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 3') ; 3,03-3,06 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 10') ; 3,36-3,39 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 4') ; 3,51-3,54 (m, 6 H, 3xCH<sub>2</sub> 6' 7' 9') ; 4,02 (s, 2 H, CH<sub>2</sub> 1') ; 6,73 (sl, 1 H, NH carbamate) ; 6,76 (s, 1 H, H3) ; 7,38-7,42 (m, 1 H, H6) ; 8,31 (dd,  $J$  = 8,1 et 1,3 Hz, 1H, H5) ; 8,42 (dd,  $J$  = 8,1 et 1,3 Hz, 1 H, H7) ; 11,03 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 28,7 (3 CH<sub>3</sub>, *t*Bu) ; 40,1 (CH<sub>2</sub>) ; 48,7 (CH<sub>2</sub>) ; 49,9 (CH<sub>2</sub>) ; 69,6 (CH<sub>2</sub>) ; 70,0 (CH<sub>2</sub>) ; 70,1 (CH<sub>2</sub>) ; 70,5 (CH<sub>2</sub>) ; 78,0 (C) ; 120,5 (CH) ; 121,4 (C) ; 121,6 (CH) ; 127,8 (CH) ; 132,9 (CH) ; 133,6 (C) ; 134,5 (C) ; 150,6 (C) ; 156,0 (C) ; 161,1 (C).



### Préparation de la 4-[[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl]aminométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **13**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 15 mL d'acide chlorhydrique (5 N dans isopropanol) ont été ajoutés sur 600 mg de 4-[[2-(*N*-boc-2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl]aminométhyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **12** (1,33 mmol, 1 équiv.) et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 4 h. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement versé dans un bécher d'eau, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait 4 fois avec du dichlorométhane (4 fois 25 mL). La phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **13** a été isolé sous forme d'huile sombre avec un rendement de 43% (0,57 mmol, 200 mg).

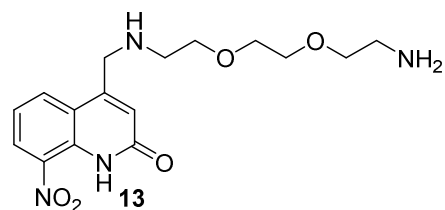
Formule brute :  $C_{16}H_{22}N_4O_5$

Apparence : Huile sombre.

Masse Molaire : 350,37 g/mol.

HRMS (ESI) calculée pour  $C_{16}H_{23}N_4O_5$   $[M+H]^+$  351,1668, trouvée 351,1674.

RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,5 (s, 1 H, NH amine) ; 2,63-2,66 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 10') ; 2,74-2,77 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 3') ; 3,35-3,38 (m, 2 H, CH<sub>2</sub> 9') ; 3,49-3,55 (m, 6 H, 3xCH<sub>2</sub> 4' 6' 7') ; 4,01 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub> 1') ; 6,76 (sl, 1 H, H3) ; 7,38-7,42 (m, 1 H, H6) ; 8,30 (dd,  $J$  = 8,1 et 1,3 Hz, 1 H, H5) ; 8,40 (dd,  $J$  = 8,1 et 1,3 Hz, 1 H, H7) ; 11,0 (sl, 1 H, NH lactame). RMN  $^{13}C$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 41,7 (CH<sub>2</sub>) ; 48,7 (CH<sub>2</sub>) ; 50,0 (CH<sub>2</sub>) ; 70,0 (CH<sub>2</sub>) ; 70,1 (CH<sub>2</sub>) ; 70,6 (CH<sub>2</sub>) ; 73,2 (CH<sub>2</sub>) ; 120,4 (CH) ; 121,4 (C) ; 121,5 (CH) ; 127,7 (CH) ; 132,8 (CH) ; 133,7 (C) ; 134,6 (C) ; 150,7 (C) ; 161,2 (C).





**Préparation de la 2,4-dibromo-8-nitroquinoléine **14****<sup>325</sup>

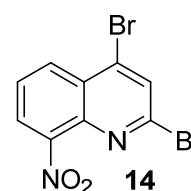
Dans un ballon bicol de 100 mL refroidi dans un bain de glace, 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) ont été ajoutés sur 3 g de 2,4-dibromoquinoléine (10,5 mmol, 1 équiv.). Une solution de 2 mL de HNO<sub>3</sub> à 65% (31,5 mmol, 3 équiv.) a été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel agité à t.a. pendant 2 h. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement versé dans un bécher d'eau, alcalinisé par de la soude et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a alors été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (90/10). Le composé **14** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 56% (6 mmol, 2 g).

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 129 °C (Lit : 129 °C).<sup>325</sup>

Masse Molaire : 331,95 g/mol.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,72-7,76 (m, 1 H, H6) ; 8,00 (s, 1 H, H3) ; 8,08 (dd, *J* = 7,6 et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,39 (dd, *J* = 8,5 et 1,4 Hz 1 H, H7). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>-d<sub>6</sub>) δ: 125,3 (CH) ; 126,9 (CH) ; 127,5 (C) ; 130,9 (CH) ; 131,0 (CH) ; 135,0 (C) ; 139,7 (C) ; 143,6 (C) ; 147,5 (C).

**Préparation de la 4-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **15****<sup>325</sup>

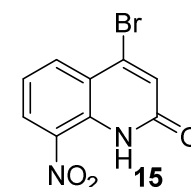
Dans un tube scellé, 10 mL d'acétonitrile et 500 µL d'une solution d'acide perchlorique à 70% (5,4 mmol, 6 équiv.) ont été ajoutés sur 300 mg de 2,4-dibromo-8-nitroquinoléine (0,90 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C dans un réacteur micro-onde pendant 30 min. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **15** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 87% (0,78 mmol, 211 mg).

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 239 °C (Lit : 240 °C).<sup>325</sup>

Masse Molaire : 269,05 g/mol.



<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 2377-2386.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,20 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H3) ; 7,37-7,42 (m, 1 H, H6) ; 8,36 (dd,  $J = 8,0$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,58 (dd,  $J = 8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 121,0 (C) ; 122,6 (CH) ; 126,9 (CH) ; 129,4 (CH) ; 132,7 (C) ; 134,8 (C) ; 135,5 (CH) ; 136,5 (C) ; 159,5 (C).

### Préparation de la quinoléin-2(1H)-one **16**<sup>332</sup>

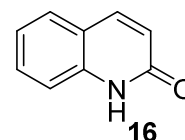
Dans un ballon bicol de 250 mL, 30 mL d'acétonitrile et 30 mL d'une solution d'acide perchlorique à 70% ont été ajoutés sur 5 g de 2-chloroquinoléine (30,6 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C et agité pendant 72 h. Le mélange réactionnel a été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 100 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (80/20). Le composé **16** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 74% (22,7 mmol, 3,3 g).

Formule brute :  $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 198 °C (Lit : 193 °C)<sup>360</sup>

Masse Molaire : 145,16 g/mol.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,72 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1 H, H3) ; 7,20-7,25 (m, 1 H, H6) ; 7,40-7,42 (m, 1 H, H5) ; 7,50-7,54 (m, 1 H, H7) ; 7,56-7,58 (m, 1 H, H8) ; 7,82 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1 H, H4) ; 11,97 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 116,3 (CH) ; 119,9 (C) ; 121,3 (CH) ; 122,7 (CH) ; 127,7 (CH) ; 130,7 (CH) ; 138,5 (C) ; 141,1 (CH) ; 164,7 (C).

### Préparation de la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one **17**<sup>335</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL refroidi dans un bain de glace, 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%) ont été ajoutés sur 1 g de quinoléine-2(1H)-one **16** (6,9 mmol, 1 équiv.). Une solution de 1,3 mL de  $\text{HNO}_3$  à 65% (20,7 mmol, 3 équiv.) a ensuite été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 1 h. Le mélange réactionnel a été successivement versé dans un bécher d'eau, alcalinisé par du  $\text{NaOH}$  et extrait deux fois avec du dichlorométhane (2 fois 50 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **17** a été recristallisé dans de l'isopropanol et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 91% (6,3 mmol, 1,2 g).

<sup>332</sup> V. Andreev et Y. P. Nizhnik, *Russian J. Org. Chem.* **2002**, 38, 137-138.

<sup>360</sup> A. R. Todorov, T. Wirtanen, J. Helaja, *J. Org. Chem.*, **2017**, 82, 13756-13767.

<sup>335</sup> A. Van Oeveren, M. Motamedi, E. Martinborough *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 1527-1531.

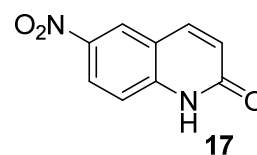
Formule brute :  $C_9H_6N_2O_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 279 °C (Lit : 279 °C).<sup>335</sup>

Masse Molaire : 190,16 g/mol.

RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6,68 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1 H, H3) ; 7,43 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1 H, H8) ; 8,12 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1 H, H4) ; 8,33 (dd,  $J = 2,6$  et 9,0 Hz, 1 H, H7) ; 8,70 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H, H5) ; 12,3 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 116,3 (CH) ; 118,7 (C) ; 124,0 (CH) ; 124,5 (CH) ; 125,3 (CH) ; 140,3 (CH) ; 141,7 (C) ; 143,5 (C) ; 162,1 (C).



### Préparation de la *N*-méthylquinoléin-2(1*H*)-one **18**<sup>336</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 30 mL de DMF ont été ajoutés sur 1 g de quinoléine-2(1*H*)-one **15** (6,9 mmol, 1 équiv.) et 1,43 g de  $K_2CO_3$  (10,3 mmol, 1,5 équiv.). Le milieu réactionnel a été chauffé à 80°C et 430  $\mu$ L d'iodure de méthyle (6,9 mmol, 1 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Après 48 h, le milieu réactionnel a été versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique a été lavée 5 fois, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (75/25). Le composé **18** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 71% (4,90 mmol, 780 mg).

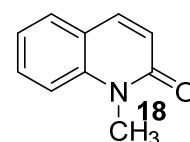
Formule brute :  $C_{10}H_9NO$

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 76 °C (Lit: 74 °C)<sup>336</sup>

Masse Molaire : 159,19 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3,73 (s, 3 H,  $CH_3$ ) ; 6,71 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1 H, H3) ; 7,21-7,25 (m, 1 H, H6) ; 7,37 (dd,  $J = 8,1$  et 1,0 Hz, 1 H, H5) ; 7,55-7,59 (m, 2 H, H7 - H8) ; 7,67 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1 H, H4). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 29,4 ( $CH_3$ ) ; 114,1 (CH) ; 120,6 (C) ; 121,7 (CH) ; 122,1 (CH) ; 128,7 (CH) ; 130,6 (CH) ; 138,9 (CH) ; 140,0 (C) ; 162,3 (C).



<sup>336</sup> E. Rosenhauer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1924**, 57, 1291-1294.

<sup>336</sup> . Rosenhauer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1924**, 57, 1291-1294.

**Préparation de la 2-chloro-5-nitroquinoléine **19** et de la 2-chloro-8-nitroquinoléine **20****<sup>323</sup>

Dans un ballon de 250 mL refroidi dans un bain de glace, 40 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) ont été ajoutés sur 5 g de 2-chloroquinoléine (30,6 mmol, 1 équiv.). Une solution de 12 mL de HNO<sub>3</sub> à 65% (183 mmol, 6 équiv.) a ensuite été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel agité à t.a. pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été successivement versé dans un bécher d'eau, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 100 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (80/20). Les composés **19** et **20** ont été séparés, isolés et recristallisés dans de l'isopropanol sous forme de poudres blanchâtres, avec des rendements respectifs de 14% (4,3 mmol, 0,9 g) et 50% (15,3 mmol, 3,2 g).

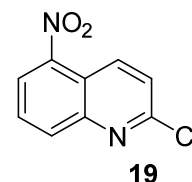
Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Apparence : Poudre blanchâtre.

Point de fusion : 134  C (Lit : 133-134  C)<sup>323</sup>.

Masse Molaire : 208,60 g/mol.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  : 7,63 (d, J = 9,1 Hz, 1 H, H4) ; 7,82-7,87 (m, 1 H, H7) ; 8,34 (dd, J = 8,6 et 0,7 Hz, 1 H, H8) ; 8,40 (dd, J = 7,6 et 1,2 Hz, 1 H, H6) ; 8,99 (d, J = 9,2 Hz, 1 H, H3). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  : 120,1 (C) ; 125,0 (CH) ; 125,6 (CH) ; 129,0 (CH) ; 135,1 (CH) ; 135,7 (CH) ; 145,6 (C) ; 148,2 (C) ; 152,6 (C).



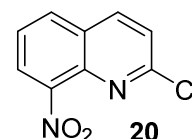
Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Apparence : Poudre blanchâtre.

Point de fusion : 152  C (Lit : 152  C)<sup>323</sup>.

Masse Molaire : 208,60 g/mol.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  : 7,56 (d, J = 8,7 Hz, 1 H, H4) ; 7,65-7,69 (m, 1 H, H6) ; 8,07 (dd, J = 8,3 et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,11 (dd, J = 7,6 et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 8,23 (d, J = 8,7 Hz, 1 H, H3). RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  : 124,6 (CH) ; 124,9 (CH) ; 125,8 (CH) ; 127,6 (C) ; 131,8 (CH) ; 138,6 (CH) ; 139,0 (C) ; 147,1 (C) ; 153,6 (C).

**Préparation de la 5-nitroquinolin-2(1H)-one **21****<sup>323</sup>

Dans un ballon bicol de 50 mL, 10 mL d'acétonitrile et 10 mL d'une solution d'acide perchlorique à 70% ont été ajoutés sur 500 mg de 2-chloro-5-nitroquin line **19** (2,4 mmol, 1  quiv.). Le milieu réactionnel a par la suite été agité à 100 C pendant 72 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du KOH et extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 25 mL). La phase

<sup>323</sup> L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 54, 75-86.

<sup>323</sup> L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 54, 75-86.

organique résultante a été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **21** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 92% (2,2 mmol, 418 mg).

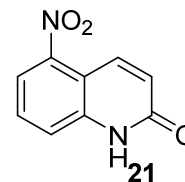
Formule brute :  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 302 °C (Lit : 302 °C)<sup>323</sup>.

Masse Molaire : 190,16 g/mol.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6,76 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1 H, H3) ; 7,65-7,73 (m, 2 H, H7 H8) ; 7,88 (dd,  $J = 7,7$  et 1,3 Hz, 1 H, H6) ; 8,25 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1 H, H4) ; 12,3 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 111,9 (C) ; 118,9 (CH) ; 121,5 (CH) ; 125,8 (CH) ; 130,6 (CH) ; 134,7 (CH) ; 140,7 (C) ; 146,7 (C) ; 161,3 (C).



### Préparation de la 8-nitroquinolin-2(1H)-one **22**<sup>323</sup>

Dans un ballon bicol de 250 mL, 25 mL d'acétonitrile et 25 mL d'une solution d'acide perchlorique à 70% ont été ajoutés sur 2,3 g de 2-chloro-8-nitroquinoléine **20** (11 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a été agité à 100°C pendant 72 h. Le mélange réactionnel a été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du KOH et extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **22** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 96% (10,6 mmol, 2,02 g).

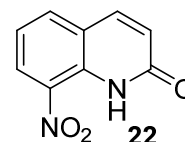
Formule brute :  $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 163 °C (Lit : 163 °C)<sup>323</sup>.

Masse Molaire : 190,16 g/mol.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,79 (dd,  $J = 9,7$  et 2,0 Hz, 1H, H3) ; 7,32-7,36 (m, 1 H, H6) ; 7,82 (d,  $J = 9,7$  et 1,4 Hz, 1 H, H4) ; 7,91 (dd,  $J = 7,6$  Hz, 1 H, H5) ; 8,53 (dd,  $J = 8,4$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,3 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 121,4 (CH) ; 122,1 (C) ; 123,8 (CH) ; 127,9 (CH) ; 133,1 (C) ; 133,9 (C) ; 135,6 (CH) ; 139,9 (CH) ; 161,6 (C).



### Préparation de la 2-méthoxy-8-nitroquinoléine **23**<sup>338</sup>

Sous atmosphère inerte (Argon), 100 mg de 8-nitroquinolin-2(1H)-one **22** (0,53 mmol, 1 équiv.) ont été solubilisés dans 5 mL de DMF et ajoutés sur 42 mg de d'hydruure de sodium à 60% (1,05 mmol, 2 équiv.) solubilisés dans 5 mL de DMF, dans un tube scellé de 25 mL. Après 10 min d'agitation à t.a., 65  $\mu\text{L}$  d'iodure de méthyle (1,05 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à t.a.

<sup>323</sup> L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 54, 75-86.

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 5419-5434.

pendant 24 h, avant d'être versé dans un bain de glace. Le précipité obtenu a alors été filtré et séché sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'éther diéthylique. Le composé **23** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 64% (0,34 mmol, 70 mg).

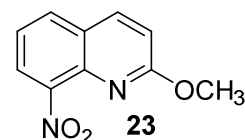
Formule brute :  $C_{10}H_8N_2O_3$

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 125 °C (Lit : 114 °C).<sup>323</sup>

Masse Molaire : 204,18 g/mol.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4,09 (s, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,05 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1 H, H3) ; 7,42-7,46 (m, 1 H, H6) ; 7,93 (dd,  $J = 8,1$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 7,99 (dd,  $J = 7,6$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 8,07 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1 H, H4). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 54,1 ( $CH_3$ ) ; 115,1 (CH) ; 122,6 (CH) ; 124,0 (CH) ; 126,2 (C) ; 131,5 (CH) ; 138,2 (C) ; 138,5 (CH) ; 146,6 (C) ; 163,7 (C).



### Préparation de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24**<sup>339</sup>

Dans un ballon bicol de 250 mL, 50 mL d'une solution d'acide bromhydrique à 48% ont été ajoutés sur 1,34 g de 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22** (7,05 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été agité à 100°C avant que 3,2 g de bromate de sodium (21,1 mmol, 3 équiv.) soient ajoutés avec précaution (Dégagement de  $Br_2$ ). Après 5 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 2 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de  $Br_2$  restantes et ensuite successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $K_2CO_3$  et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50). Le composé **24** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec un rendement de 68% (4,8 mmol, 1,3 g).

Formule brute :  $C_9H_5BrN_2O_3$

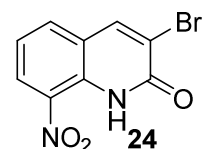
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 216 °C.

Masse Molaire : 269,05 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_9H_5BrN_2O_3$   $[M+H]^+$  268,9562, trouvée 268,9562.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,36-7,40 (m, 1 H, H6) ; 7,89 (dd,  $J = 8,4$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,6 (s, 1 H, H4) ; 8,56 (dd,  $J = 7,7$  et 1,6 Hz, 1 H, H7) ; 11,51 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :



<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

119,9 (C) ; 122,1 (CH) ; 122,3 (C) ; 128,0 (CH) ; 132,9 (C) ; 133,2 (C) ; 134,8 (CH) ; 141,0 (CH) ; 157,5 (C).

### Préparation de la 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **25**

Dans un ballon bicol de 250 mL, 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 37% ont été ajoutés sur 1 g de 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22** (5,3 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été agité à 100°C avant que 1.7 g de chlorate de sodium (15,8 mmol, 3 équiv.) soient ajoutés avec précaution (dégagement de Cl<sub>2</sub>). Après 45 min à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 2 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de Cl<sub>2</sub> restantes et ensuite successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'éther diéthylique. Le composé **25** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec un rendement de 62% (3,3 mmol, 738 mg).

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

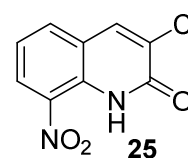
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 195 °C.

Masse Molaire : 224,60 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 225,0067, trouvée 225,0070.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,37-7,41 (m, 1 H, H6) ; 7,88 (dd, *J* = 7,7 et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,04 (s, 1 H, H4) ; 8,55 (dd, *J* = 8,4 et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,56 (sl, 1 H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 121,8 (C) ; 122,2 (CH) ; 127,9 (CH) ; 129,2 (C) ; 132,3 (C) ; 133,1 (C) ; 134,9 (CH) ; 137,0 (CH) ; 157,5 (C).



### Préparation de la 3-bromo-2-méthoxy-8-nitroquinoléine **26**<sup>338</sup>

Sous atmosphère inerte (Argon), 250 mg de 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** (0,93 mmol, 1 équiv.) ont été solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre et ont été ajoutés sur 74 mg d'hydruure de sodium à 60% (1,86 mmol, 2 équiv.) également solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre. Après 10 min d'agitation à t.a., 115 µL d'iodure de méthyle (1,86 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 24 h, avant d'être versé dans un bain de glace. Le précipité obtenu a été filtré et séché sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (90/10). Le composé **26** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 55% (0,51 mmol, 146 mg).

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5419-5434.



Formule brute :  $C_{10}H_7BrN_2O_3$

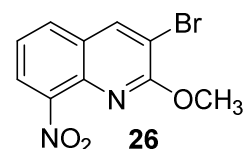
Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 208 °C.

Masse Molaire : 283,08 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_{10}H_7BrN_2O_3$   $[M+H]^+$  282,9718, trouvée 282,9722.

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4,15 (s, 3 H,  $CH_3$ ) ; 7,43-7,49 (m, 1 H, H6) ; 7,86 (dd,  $J = 8,1$  et  $1,4$  Hz, 1 H, H5) ; 8,02 (dd,  $J = 7,7$  et  $1,4$  Hz, 1 H, H7) ; 8,35 (s, 1 H, H4). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 55,4 ( $CH_3$ ) ; 110,4 (C) ; 123,5 (CH) ; 124,4 (CH) ; 127,1 (C) ; 130,6 (CH) ; 136,7 (C) ; 140,6 (CH) ; 146,2 (C) ; 159,2 (C).



### Préparation de la 8-amino-3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one 27

Dans un ballon bicol de 100 mL, 20 mL d'éthanol ont été ajoutés sur 300 mg de 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one 24 (1,11 mmol, 1 équiv.) et 1,1 g de chlorure d'étain (II) (5,55 mmol, 5 équiv.). Le milieu réactionnel a été porté à reflux pendant 3 h. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement neutralisé par une solution aqueuse de  $Na_2CO_3$ , filtré sur celite, extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 25 mL) et une fois à l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase organique a été lavée, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5). Le composé **27** a été isolé sous forme de poudre marron clair avec un rendement de 55% (0,61 mmol, 145 mg).

Formule brute :  $C_9H_7BrN_2O$

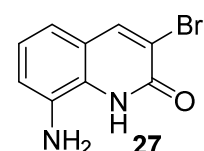
Apparence : Poudre marron clair.

Point de fusion : 248 °C.

Masse Molaire : 239,07 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_9H_7BrN_2O$   $[M+H]^+$  238,9820, trouvée 238,9820.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $DMSO-D_6-d_6$ )  $\delta$ : 5,60 (sl, 2 H,  $NH_2$ ) ; 6,84 (dd,  $J = 7,5$  et  $1,5$  Hz, 1 H, H7) ; 6,90 (dd,  $J = 7,7$  et  $1,5$  Hz, 1 H, H5) ; 6,95-6,99 (m, 1 H, H6) ; 8,40 (s, 1 H, H4) ; 11,35 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $DMSO-D_6-d_6$ )  $\delta$ : 115,2 (CH) ; 115,5 (CH) ; 116,6 (C) ; 120,6 (C) ; 123,5 (CH) ; 125,6 (C) ; 135,4 (C) ; 143,2 (CH) ; 158,3 (C).



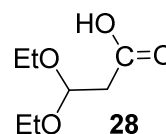
**Préparation de l'acide 3-3'-diéthoxypropionique 28<sup>344</sup>**

Dans un ballon bicol de 250 mL, 10,2 mL de 3-3'-diéthoxypropionate d'éthyle (52,6 mmol, 1 équiv.) ont été ajoutés sur 2,84 g de NaOH (71 mmol, 1,35 équiv.) solubilisés dans 20 mL d'H<sub>2</sub>O. Le milieu réactionnel a ensuite été porté à reflux pendant 30 min. Après un retour à t.a., le mélange réactionnel a été neutralisé par ajout d'une solution de HCl à 37% puis extrait deux fois à l'acétate d'éthyle (2 fois 50 mL) et une fois au dichlorométhane (50 mL). La phase organique a été successivement lavée avec de l'eau à pH = 1, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le composé **28** a été isolé sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 68% (35,9 mmol, 5,83 g).

Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

Apparence : Huile jaunâtre.

Masse Molaire : 162,18 g/mol.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,1 (t, *J* = 7,0 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>) ; 2,5 (d, *J* = 1,95 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>CO) ; 3,43-3,50 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>) ; 3,54-3,62 (m, 2 H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>) ; 4,8 (t, *J* = 5,9 Hz, 1 H, CH) ; 12,1 (sl, 1 H, COOH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 15,6 (2xCH<sub>3</sub>) ; 40,3 (2xCH<sub>2</sub>) ; 61,6 (CH<sub>2</sub>) ; 100,0 (CH) ; 171,4 (C).

**Préparation de la 2-nitro-3-méthoxyaniline 29**

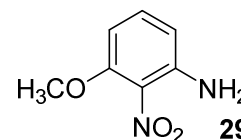
Dans un tube scellé de 25 mL, 10 mL d'une solution méthanolique d'ammoniac à 7N ont été ajoutés sur 1 g de 3-fluoro-2-nitroanisole (5,8 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 70 °C pendant 24 h. Après un retour à t.a., le mélange réactionnel a été versé dans un bécher d'eau, puis extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique a été successivement lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/cyclohexane (90/10). Le composé **29** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 20% (1,18 mmol, 200 mg).

Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

Apparence : Poudre Jaune.

Point de fusion : 124 °C (Lit : 124 °C).<sup>361</sup>

Masse Molaire : 168,15 g/mol.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3,86 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 4,87 (sl, 2 H, NH<sub>2</sub>) ; 6,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H, H<sub>6</sub>) ; 6,36 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, H<sub>4</sub>) ; 7,15 (t, *J* = 8,2 Hz, 1 H, H<sub>5</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 56,4 (CH<sub>3</sub>) ; 100,8 (CH) ; 109,7 (CH) ; 132,6 (C) ; 133,1 (CH) ; 143,2 (C) ; 154,7 (C).

<sup>344</sup> F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke *et al.*, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 306-311.

<sup>361</sup> L. S. Ciereszko et L. V. Hanks, *JACS*, **1954**, 76, 2500-2501.

**Procédure générale pour la préparation de la 5-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **30**, 6-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **31**, 7-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **32**, 5-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **33**, 6-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **34** et 7-méthoxy-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **35**.**<sup>344</sup>

Dans une première étape, selon un protocole préalablement décrit, 1,2 équiv. de chlorure de 3,3'-diéthoxyacryloyle (préparé à partir de l'acide 3-3'-diéthoxypropionique par réaction avec SOCl<sub>2</sub>) ont été ajoutés au goutte à t.a. à une solution contenant 1 équiv. de la nitroaniline correspondante, 2 équiv. de pyridine et 50 mL de dichlorométhane. Les milieux réactionnels ont ensuite été versés dans un bécher d'eau et extraits trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). Les phases organiques résultantes ont été lavées avec du brine, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporées sous pression réduite. Dans une seconde étape, les bruts réactionnels ont été mis en présence de 25 mL d'acide sulfurique à 98% et agités à t.a. pendant 3 à 4 h (suivi réalisé par CCM). Les milieux réactionnels ont ensuite été versés dans un bain de glace, alcalinisés par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extraits trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). Les phases organiques résultantes ont été lavées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporées sous pression réduite. Les bruts réactionnels finaux ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un éluant adapté.

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

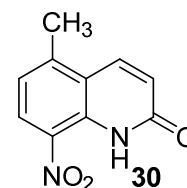
Apparence : Poudre marron clair.

Point de fusion : 213 °C.

Masse Molaire : 204,18 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 205,0613, trouvée 205,0608.

Le composé **30** a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10), isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme d'une poudre marron clair avec un rendement de 46% (2,39 mmol, 490 mg). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2,67 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 6,78 (dd, *J* = 10,0 et 2,2 Hz, 1 H, H<sub>3</sub>) ; 7,15 (dd, *J* = 8,5 et 0,6 Hz, 1 H, H<sub>6</sub>) ; 7,99 (d, *J* = 10,0 Hz, 1 H, H<sub>4</sub>) ; 8,40 (d, *J* = 8,5 Hz, 1 H, H<sub>7</sub>) ; 11,5 (sl, 1 H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 19,8 (CH<sub>3</sub>) ; 120,1 (C) ; 123,1 (CH) ; 123,3 (CH) ; 127,8 (CH) ; 131,7 (C) ; 134,1 (C) 136,6 (CH) ; 145,4 (C) ; 161,3 (C).

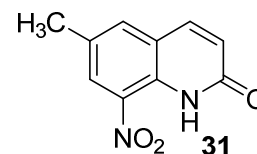


Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Apparence : Poudre marron.

Point de fusion : 200 °C (Lit : 199-200)<sup>362</sup>

Masse Molaire : 204,18 g/mol.



<sup>344</sup> F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke *et al.*, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 306-311.

<sup>362</sup> T. Hashimoto, *Yakugaku Zasshi*, **1955**, 75, 340-342.

Le composé **31** a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10) et isolé sous forme d'une poudre marron avec un rendement de 6% (0,34 mmol, 70 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,50 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ; 6,74 (dd,  $J = 9,7$  et  $2,0$  Hz, 1 H, H3) ; 7,69 (s, 1 H, H5) ; 7,74 (d,  $J = 9,7$  Hz, 1 H, H4) ; 8,33 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H7) ; 11,22 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20,5 ( $\text{CH}_3$ ) ; 122,0 (C) ; 123,7 (CH) ; 128,4 (CH) ; 131,7 (C) ; 131,8 (C) ; 132,8 (C) ; 135,9 (CH) 139,7 (CH) ; 161,6 (C).

Formule brute :  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$

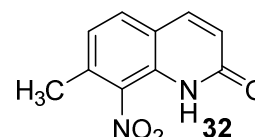
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 233 °C.

Masse Molaire : 204,18 g/mol.

HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  205.0613, trouvée 205.0615.

Le composé **32** a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 52% (3,42 mmol, 700 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,64 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 6,69 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1 H, H6) ; 7,15 (dd,  $J = 8,0$  et  $0,6$  Hz, 1 H, H3) ; 7,64 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H, H4) ; 7,74 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1 H, H5) ; 10,12 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21,2 ( $\text{CH}_3$ ) ; 119,7 (C) ; 122,7 (CH) ; 125,5 (CH) ; 132,2 (CH) ; 132,6 (C) ; 135,6 (C) 137,6 (C) ; 139,9 (CH) ; 161,7 (C).



Formule brute :  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$

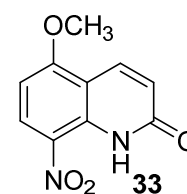
Apparence : Poudre orange foncé.

Point de fusion : 246 °C.

Masse Molaire : 220,18 g/mol.

HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  221,0562, trouvée 221,0561.

Le composé **33** a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10) et isolé sous forme de poudre orange foncé avec un rendement de 21% (0,61 mmol, 135 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,09 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ) ; 6,68 (dd,  $J = 10,0$  et  $2,1$  Hz, 1 H, H3) ; 6,73 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1 H, H6) ; 8,17 (d,  $J = 9,9$  Hz, 1 H, H4) ; 8,52 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1 H, H7) ; 11,45 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 56,8 ( $\text{OCH}_3$ ) ; 102,8 (CH) ; 110,7 (C) ; 121,8 (CH) ; 127,0 (C) ; 130,6 (CH) ; 134,6 (CH) 135,6 (C) ; 161,7 (C) ; 161,8 (C).



Formule brute :  $C_{10}H_8N_2O_4$

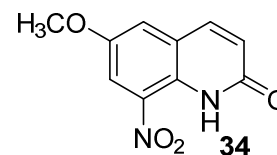
Apparence : Poudre marron clair.

Point de fusion : 210 °C (Lit : 210-211 °C)<sup>363</sup>

Masse Molaire : 220,18 g/mol.

Le composé **34** ( $C_{10}H_8N_2O_4$ ) a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (90/10) et isolé sous forme de poudre marron clair avec un rendement de 4% (0,05 mmol, 12 mg).

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3,93 (s, 3 H,  $OCH_3$ ) ; 6,76 (dd,  $J = 9,7$  et 1,8 Hz, 1 H, H3) ; 7,42 (d,  $J = 2,9$  Hz, 1 H, H5) ; 7,73 (d,  $J = 9,7$  Hz, 1 H, H4) ; 8,07 (d,  $J = 2,9$  Hz, 1 H, H7) ; 11,15 (sl, 1H, NH).  
RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 56,3 ( $OCH_3$ ) ; 113,5 (CH) ; 113,9 (C) ; 120,7 (CH) ; 122,9 (C) ; 124,4 (CH) ; 128,3 (C) 139,4 (CH) ; 153,5 (C) ; 161,4 (C).



Formule brute :  $C_{10}H_8N_2O_4$

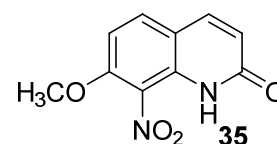
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 244 °C.

Masse Molaire : 220,18 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_{10}H_8N_2O_3 [M+H]^+$  221,0562, trouvée 221,0556.

Le composé **35** ( $C_{10}H_8N_2O_4$ ) a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (90/10) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 45% (0,79 mmol, 175 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4,04 (s, 3 H,  $OCH_3$ ) ; 6,57 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1 H, H3) ; 6,93 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1 H, H6) ; 7,68 (d,  $J = 9,3$  Hz, 2 H, H4 H5) ; 9,9 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 57,2 ( $OCH_3$ ) ; 105,0 (C) ; 106,9 (CH) ; 114,3 (C) ; 120,6 (CH) ; 133,5 (CH) ; 133,7 (C) 139,9 (CH) ; 155,9 (C) ; 161,8 (C).



### 3. Partie Biologie

#### Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de *Leishmania infantum*.<sup>364</sup>

Des promastigotes de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Montpellier Leishmania, France, exprimant la luciférase) en phase logarithmique, cultivés dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100  $\mu$ g/mL de streptomycine), ont été centrifugés à 900g pendant 10 minutes. La surnageant a été enlevé avec attention et a été remplacé avec le même volume de milieu RPMI 1640 ajusté à pH = 5,4 et incubé pendant 24 h à 24 °C. Les promastigotes acidifiés ont ensuite été incubés à 24 h à 37 °C dans une flasque

<sup>363</sup> K. Mislow, J.B. Koepfli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 1553-1556.

<sup>364</sup> C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A. F. Alvarez *et al. Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 143, 1635-1643.

ventilée. Les promastigotes ont ainsi été transformés en amastigotes axéniques. L'effet des molécules testées sur la croissance des amastigotes axéniques de *L. infantum* a été évalué comme suit. Les amastigotes ont été incubés à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans des plaques 96 puits avec diverses concentrations de produits solubilisés dans du DMSO-d6 (concentration finale inférieure à 0,5%) en duplicata. Les contrôles DMSO-d6, amphotéricine B, miltéfosine et fexinidazole (les médicaments de références ont été achetées à Sigma-Aldrich) ont été ajoutés lors de chaque expérience. Après 48 h d'incubation à 37 °C, chaque plaque a été observée au microscope afin de détecter l'éventuelle présence de précipités. Pour estimer l'activité de la luciférase des amastigotes axéniques, 80 µL de chaque puit a été transféré dans une plaque blanche de 96 puits, le réactif Steady Glow® (Promega) a été ajouté selon les recommandations du fabricant, et les plaques incubées pendant 2 minutes. La luminescence a été mesurée par le compteur de luminescence Microbeta (PerkinElmer). La concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) a été définie comme la concentration de composé requise pour inhiber 50% de l'activité métabolique des amastigotes de *L. infantum* en comparaison avec le contrôle. Les valeurs de CI<sub>50</sub> ont été calculées via une analyse de régression non-linéaire traitées selon des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de CI<sub>50</sub> représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

#### **Evaluation de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires HepG2.**

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules testées sur des cellules HepG2 (certifiées sans mycoplasmes, ref 85011430-1VL chez Sigma-Aldrich) a été réalisée selon la méthode de Mosman.<sup>350</sup> Des cellules (à une concentration de  $5 \times 10^4$ /mL) dans 100 µL de milieu Alpha MEM Eagle supplémenté avec du 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL stréptomycine) ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et incubées à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24 h d'incubation, 100 µL de milieu avec diverses concentrations de produit et les contrôles appropriés ont été ajoutés et les plaques incubées pendant 72 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Chaque plaque a ensuite été examinée au microscope afin d'observer l'éventuelle formation de précipités avant que le milieu ne soit aspiré de ces puits. 100 µL d'une solution de MTT à 0,5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puit et les cellules incubées pendant 2 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après ce temps, la solution de MTT a été aspirée de chaque puit et 100 µL de DMSO-D6 a été ajouté dans chacun d'entre eux pour solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 570 nm sur un spectrophotomètre Eon BioTek. Le DMSO-D6 a été utilisé comme blanc et la doxorubicine comme contrôle positif. Les CC<sub>50</sub> ont été calculées par une analyse de régression non linéaire sur des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Elles représentent la valeur moyenne calculées depuis 3 expériences réalisées indépendamment.

---

<sup>350</sup> T. J. Mosman, *Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63

### Evaluation de la mutagénicité via un test d'Ames.

Le test de mutagénicité a été réalisé en suivant une version modifiée du protocole classique de test d'Ames.<sup>365</sup> Les souches de *Salmonella Typhimurium* (TA97a, TA98, TA100, TA102) ont été cultivées pendant une nuit dans du milieu Nutrient Broth n°2 (Oxoid, France). Après cette période d'incubation, des solutions de molécules testées à 5 ou 50 mM dans du DMSO ont été ajoutées à 0,1 mM de milieu culture et incubées avec 4% de S9-mix pendant 1h à 37 °C, sous agitation. Chaque molécule a été testée en duplicata. Après l'incubation, 2 mL de Top Agar fondu ont été mélangés avec la solution pré-incubée de molécule testée et versés dans des plaquesensemencées avec de l'agar Vogel-Bonner. Après 48h à 37 °C à l'obscurité, le nombre de révertants spontanés induit par la molécule testée a été déterminé pour chaque dose *via* un compteur de colonies bactériennes laser. Un produit est considéré comme mutagène quand il induit une augmentation d'un facteur 2 du nombre de révertants, comparé à un contrôle négatif. Le benzo[ $\alpha$ ]pyrène a été utilisé comme contrôle positif pour toutes les souches de *Salmonella* en présence de S9-mix.

### Evaluation de la génotoxicité *via* un test des comètes.

Le test des comètes a été utilisé pour détecter les cassures d'ADN et les sites alcali-labiles. Des cellules HepG2 trypsinées ont été incorporées dans de l'agarose à 0,7% à point de fusion de bas (Sigma-Aldrich) et déposées sur du film de polyester pré-découpé (film Gelbond®) pour réaliser des mini-dépôts comme décrit précédemment.<sup>354</sup> Le film a ensuite été placé dans une solution de lyse (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 M, Tris 10 mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO-D6, pH 10) pendant 18 h à 4°C. L'électrophorèse (avec une solution contenant du NaOH à 0,3M, du Na<sub>2</sub>EDTA à 1 mM, pH >13) a été réalisée pendant 24 minutes dans un réservoir avec une alimentation de 28V (soit 0,8 V/cm). Après l'électrophorèse, le film a été immergé pendant 2x 5 min dans du PBS pour le neutraliser, suivi d'une fixation dans de l'éthanol pendant 1,5 h et d'un séchage. Après coloration avec du SYBR® Gold à une dilution de x10 000 pendant 20 minutes, les films ont été observés à un grossissement de x20 *via* un microscope d'épifluorescence équipé d'une plateforme automatisée Nikon, d'une caméra DS-Q1Mc et du logiciel de capture automatique d'images Nikon NiS Element Advanced Research. Dans ces images, pour chaque cellule, le niveau de dommages sur l'ADN a été évalué par un système semi-automatique de score, par la mesure de l'intensité des pixels de la queue divisée par l'intensité totale des pixels de la tête et de la queue de la comète, au moyen du logiciel « Lucia Comet Assay » (Laboratory Imaging, Prague, République Tchèque). 50 cellules par dépôts et 4 dépôts par échantillon ont été analysés. La médiane de ces 200 valeurs a été calculée et appelée % d'ADN dans la queue.

<sup>365</sup> M. De Méo, M. Laget, C. Di Giorgio *et al.*, *Mutat. Res.*, **1996**, 340, 51-65.

<sup>354</sup> H. Perdry, K. B. Gutzkow, M. Chevalier *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2018, DOI : 10.1002/em.22204.





## Research paper

## Novel 8-nitroquinolin-2(1H)-ones as NTR-bioactivated antikinetoplastid molecules: Synthesis, electrochemical and SAR study

Julien Pedron <sup>a</sup>, Clotilde Boudot <sup>b</sup>, Sébastien Hutter <sup>c</sup>, Sandra Bourgeade-Delmas <sup>d</sup>, Jean-Luc Stigliani <sup>a</sup>, Alix Sournia-Saquet <sup>a</sup>, Alain Moreau <sup>a</sup>, Elisa Boutet-Robinet <sup>e</sup>, Lucie Paloque <sup>a</sup>, Emmanuelle Mothes <sup>a</sup>, Michèle Laget <sup>f</sup>, Laure Vendier <sup>a</sup>, Geneviève Pratiel <sup>a</sup>, Susan Wyllie <sup>g</sup>, Alan Fairlamb <sup>g</sup>, Nadine Azas <sup>c</sup>, Bertrand Courtioux <sup>b</sup>, Alexis Valentin <sup>d</sup>, Pierre Verhaeghe <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> LCC-CNRS Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025, Limoges, France

<sup>c</sup> IHU Méditerranée Infection, équipe VITROME « Vecteurs, Infections Tropicales et Méditerranéennes, 19-21 boulevard Jean Moulin, 13385, Marseille Cedex 05, France

<sup>d</sup> UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France

<sup>e</sup> Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

<sup>f</sup> UMR MD1, U1261, AMU, INSERM, SSA, IRBA, MCT, Marseille, France

<sup>g</sup> University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, Scotland, United Kingdom

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 March 2018

Received in revised form

31 May 2018

Accepted 1 June 2018

Available online 5 June 2018

## Keywords:

Anti-kinetoplastids

*Leishmania*

*Trypanosoma*

8-Nitroquinolin-2(1H)-one

Nitroreductases

Electrochemistry

## ABSTRACT

To study the antiparasitic 8-nitroquinolin-2(1H)-one pharmacophore, a series of 31 derivatives was synthesized in 1–5 steps and evaluated *in vitro* against both *Leishmania infantum* and *Trypanosoma brucei*. In parallel, the reduction potential of all molecules was measured by cyclic voltammetry. Structure-activity relationships first indicated that antileishmanial activity depends on an intramolecular hydrogen bond (described by X-ray diffraction) between the lactam function and the nitro group, which is responsible for an important shift of the redox potential (+0.3 V in comparison with 8-nitroquinoline). With the assistance of computational chemistry, a set of derivatives presenting a large range of redox potentials (from −1.1 to −0.45 V) was designed and provided a list of suitable molecules to be synthesized and tested. This approach highlighted that, in this series, only substrates with a redox potential above −0.6 V display activity toward *L. infantum*. Nevertheless, such relation between redox potentials and *in vitro* antiparasitic activities was not observed in *T. b. brucei*. Compound **22** is a new hit compound in the series, displaying both antileishmanial and antitrypanosomal activity along with a low cytotoxicity on the human HepG2 cell line. Compound **22** is selectively bioactivated by the type 1 nitroreductases (NTR1) of *L. donovani* and *T. brucei brucei*. Moreover, despite being mutagenic in the Ames test, as most of nitroaromatic derivatives, compound **22** was not genotoxic in the comet assay. Preliminary *in vitro* pharmacokinetic parameters were finally determined and pointed out a good *in vitro* microsomal stability (half-life > 40 min) and a 92% binding to human albumin.

Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Kinetoplastids are protozoan parasites responsible for deadly

mammalian infections; *Leishmania* spp and *Trypanosoma* spp being the two main genera encountered in human pathology. These parasites are transmitted to their mammalian hosts by the bite of specific insect vectors. Among the *Leishmania* genus, *L. donovani* and *L. infantum* are the two most important species responsible for visceral leishmaniasis (VL), the most severe and often lethal clinical form of the disease. Briefly, VL occurs in humans after the bite of a sandfly (*Phlebotominae*) which injects the metacyclic flagellated

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr](mailto:pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr), [pierre.verhaeghe@univ-tlse3.fr](mailto:pierre.verhaeghe@univ-tlse3.fr) (P. Verhaeghe).

promastigote stage of the parasite into the skin. Parasites are then phagocytized by macrophages and other types of mononuclear phagocytic cells where they transform into the amastigote stage and multiply, bypassing the immune system of the host. Infected cells disseminate in many tissues and organs such as lymph nodes, liver, spleen and bone marrow, leading to death [1]. In the *Trypanosoma* genus, in addition to *T. cruzi* species, causing Chagas disease in South and Central America, the *T. brucei* species (*T. brucei gambiense* or *T. brucei rhodesiense*) are responsible for Human African Trypanosomiasis (HAT), also called “sleeping sickness”. During HAT, the flagellated trypomastigote stage of the parasites penetrates into the blood stream via the bite of a “tsetse fly” and disseminates into the whole organism. In a first step of the disease, headaches, anemia, joint pain and various organ damage occur. Then, in a second step, the parasites invade the central nervous system, causing various neurological changes such as sleeping disorders (responsible for the name of the disease), abnormal tone and mobility, ataxia, psychiatric disorders, seizures, coma and finally, death [2].

It is important to note that all these kinetoplastid infections are lethal if untreated and that very few efficient, safe and affordable drugs are available on the market for the low-income infected patients living in developing countries, which makes these parasitic infections belong to the group of “Neglected Tropical Diseases” [3]. Regarding recent epidemiologic data, the WHO indicates that more than 1 billion people are at risk of contracting VL and that 300.000 new cases occur every year, responsible for about 20.000 deaths [4]. Concerning HAT, 61 million people would be at risk of contracting the disease, no clear data being available about HAT mortality [5]. Approved drugs against VL are amphotericin B, miltefosine, antimony V derivatives and pentamidine. The liposomal form of amphotericin B, although being quite efficient, is also very expensive and requires parenteral administration, which makes it unsuitable for treating most of infected patients [6]. Pentamidine and pentavalent antimony derivatives are toxic agents which use is limited by parasitic resistances and poor efficacy [7]. Miltefosine (Fig. 1) remains the only orally available drug, but it is a teratogenic molecule, preventing its use in women of child-bearing age [6]. The context of anti-HAT drugs is quite similar with only one orally available drug [8]. In addition to pentamidine, suramin is used in the treatment of the first stage of the disease, with nifurtimox in combination with eflornithine (NECT, Fig. 1) for treatment of the second (cerebral) stage of HAT. NECT has largely replaced the use of melarsoprol, a highly toxic arsenic-containing drug [2].

Unfortunately, there are very few new chemical entities under clinical trial in 2018 against both VL and HAT [8]. In this worrying context, there is a critical need to identify new active molecules

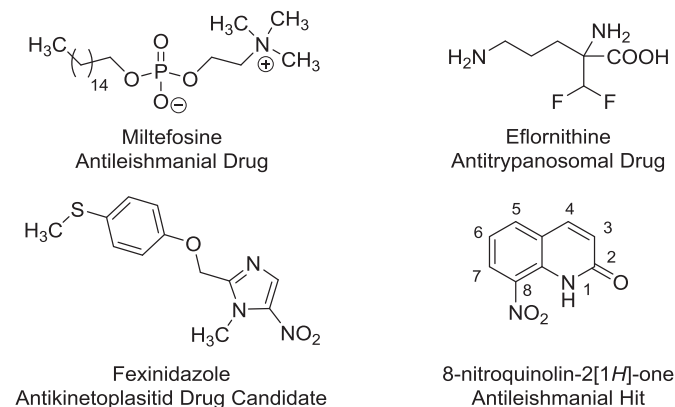
and, as observed in the field of tuberculosis, various nitroheterocycles such as delamanid and fexinidazole are re-emerging as key anti-infective molecules [9,10]. Fexinidazole (Fig. 1) is a 5-nitroimidazole derivative that was first evaluated against visceral leishmaniasis in a phase II clinical trial. Although not sufficiently efficient for use as a monotherapy for VL, fexinidazole has now demonstrated efficacy against early and late stages of HAT in a pivotal Phase III clinical trial [11,12]. Fexinidazole is part of these nitroaromatic molecules which are selectively activated by parasitic nitroreductases (NTRs) to generate electrophilic cytotoxic metabolites [13,14]. Unfortunately, no parasitic NTR X-ray structure is available and most classical rational medicinal chemistry approaches cannot be used for the design of new synthetic substrates of these key enzymes. In this context, our group initiated a research around a class of 8-nitroquinoline derivatives with antiparasitic potential [15] and identified an antileishmanial pharmacophore in 2012, corresponding to the 8-nitroquinolin-2(1H)-one scaffold (Fig. 1) [16]. Some more recent modulations of the position 4 of this pharmacophore failed to achieve more active derivatives [17,18]. Here, we present a comprehensive study of the structure-activity relationships of this pharmacophore, especially focusing on the modulation of the redox potentials. Thirty one pharmacophore derivatives, substituted at positions 3, 4, 5, 6 and 7, were synthesized and their *in vitro* cytotoxicity and activities against *L. infantum* (axenic amastigotes), and *T. brucei brucei* (trypomastigotes) were first determined. The original pharmacophore possessed poor antitrypanosomal activity, whereas a new derivative (compound 22) was identified, active against all tested kinetoplastids (*L. donovani* promastigotes, *L. donovani* intramacrophage amastigotes, *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes). The antileishmanial mechanism of action of this new hit-compound will be discussed along with its mutagenicity and genotoxicity, a key aspect concerning nitroaromatic compounds. Finally, two preliminary *in vitro* pharmacokinetic properties were measured and appear favorable for further development of this anti-kinetoplastid pharmacophore.

## 2. Results and discussion

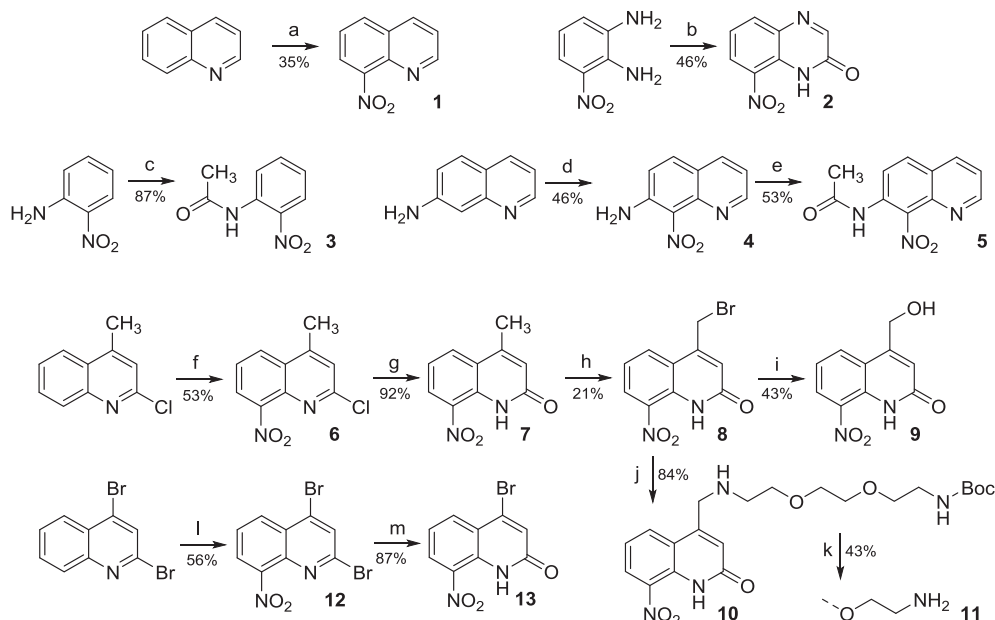
### 2.1. Chemistry

Thirty one derivatives of the initial 8-nitroquinolin-2(1H)-one pharmacophore, including 14 original ones, were prepared. As presented in Scheme 1, compounds 1–5 were obtained by classical nitration, cyclo-condensation or *N*-acetylation reactions. Nitration at position 8 of 2-chloro-4-methylquinoline afforded 6 whose chloroimino moiety reacted with perchloric acid to generate the corresponding lactam 7, according to a simple and efficient previously reported procedure [19]. Bromination of 7 with *N*-bromosuccinimide led to the bromomethyl derivative 8 which was reacted with sodium hydroxide to generate hydroxymethyl derivative 9. From bromomethyl 8, by reacting with an amine, it was also possible to access to 10 and its deprotected counterpart 11. From 2,4-dibromoquinoline, by a sequential nitration/lactamisation procedure, 12 and 13 were obtained in good yields.

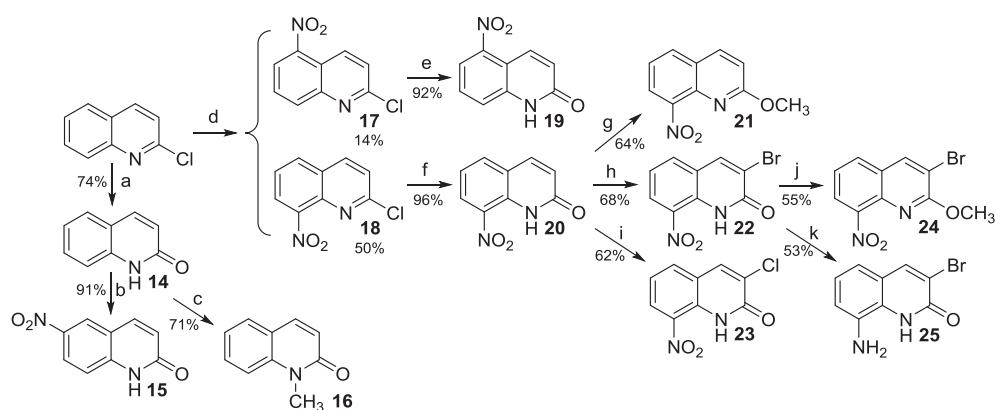
As presented in Scheme 2, the 2-chloroquinoline was the main substrate used in this work. It was first reacted with perchloric acid to generate lactam 14 which was either nitrated at position 6, to afford compound 15 or *N*-methylated with methyl iodide, to afford 16 in good yields. The nitration of 2-chloroquinoline mainly led to the 2 position isomers 17 and 18 which were transformed into the corresponding lactams 19 and 20. Compound 20 was either *O*-methylated with methyl iodide, forming 21, or selectively halogenated at position 3 by refluxing in HBr or HCl in the presence of sodium bromate or sodium chlorate, to generate derivatives 22 and



**Fig. 1.** Structures of the antikinetoplastid drugs miltefosine and eflornithine, drug-candidate fexinidazole and antileishmanial hit 8-nitroquinolin-2(1H)-one.



**Scheme 1.** Synthetic routes for the preparation of compounds 1–13. (a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 1 h; (b) glyoxylic acid, EtOH,  $80^\circ\text{C}$ , 6 h; (c)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $120^\circ\text{C}$ , 3 h; (d)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 4 h; (e)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $120^\circ\text{C}$ , 24 h; (f)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 3 h; (g)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 24 h; (h) NBS, AIBN,  $\text{CCl}_4$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 24 h; (i) NaOH,  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 24 h; (j)  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ , THF,  $50^\circ\text{C}$ , 24 h; (k) HCl (5 N in isopropanol), rt, 4 h; (l)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 2 h; (m)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ , MW,  $100^\circ\text{C}$ , 1 h.

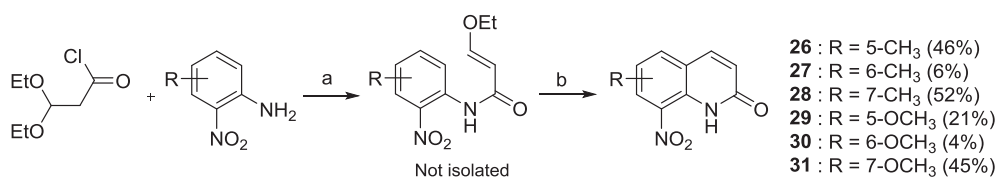


**Scheme 2.** Preparation of compounds 14–25 from 2-chloroquinoline. (a)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 72 h; (b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 1 h; (c) DMF,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 48 h; (d)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , rt, 2 h; (e)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 72 h; (f)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 72 h; (g) Ar, DMF, NaH,  $\text{CH}_3\text{I}$ , rt, 24 h; (h) NaBrO<sub>3</sub>, HBr,  $100^\circ\text{C}$ , 5 h; (i) NaClO<sub>3</sub>, HCl,  $100^\circ\text{C}$ , 45 min; (j) Ar, DMF, NaH,  $\text{CH}_3\text{I}$ , rt, 24 h; (k) EtOH,  $\text{SnCl}_2$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h.

23. Note that this specific halogenation procedure (*in situ* Br<sub>2</sub> or Cl<sub>2</sub> formation and reaction in refluxing aqueous medium), reported by O'Brien and co-workers [20], is the only one allowing selective halogenation at position 3 among many others that were tested. The 3-brominated derivative **22** reacted with methyl iodide to form O-methylated derivative **24** or was reduced into the amino-derivative **25** by using  $\text{SnCl}_2$ .

Finally, as presented in Scheme 3, we also used another

synthetic pathway allowing the preparation of 8-nitroquinolinone derivatives bearing substituents on the benzene moiety. This strategy was reported by Zaragoza and co-workers [21]. First, commercial 3,3'-diethoxyethylpropionate was saponified into the corresponding carboxylic acid which was then reacted with  $\text{SOCl}_2$  to form the acyl chloride. This acyl chloride was then reacted with various *ortho*-nitroanilines, to give the corresponding *N*-acylated products which were not isolated. In a final step, cyclization was



**Scheme 3.** Preparation of compounds 26–31 from nitroanilines substrates. (a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Pyridine, rt, 24 h; (b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , rt, 3–4 h.

operated in 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, giving the expected products 26–31. The reaction yields are moderate when using 2-nitroanilines substituted at position 3 or 5 by electron donating groups but turn to be very low when using 2-nitroanilines substituted at position 4 by the same groups.

### 3. Compound evaluation

#### 3.1. *In vitro* activity against *L. infantum* and *T. brucei brucei*: importance of the redox potential

All synthesized molecules were screened *in vitro* toward both *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes and compared with commercial reference drugs (amphotericin B and miltefosine against *L. infantum*, suramin and eflornithine against *T. brucei*) along with drug-candidate fexinidazole (Table 1). To assess antiparasitic selectivity, the cytotoxicity of all compounds was also measured on the HepG2 human cell line, using doxorubicin as control. In parallel the LogP of all compounds were calculated and the reduction potentials were measured by cyclic voltammetry in DMSO. The redox potentials measured correspond to a one electron reduction/oxidation regarding the redox couple nitro group/anion radical. Only one new hit compound (**22**) was evaluated in greater depth, as the best compound in the series regarding both activity and selectivity.

Globally, apart from molecule **24**, all synthesized compounds were soluble in aqueous medium and could be evaluated *in vitro*. Out of the 31 tested compounds, none appeared cytotoxic on the HepG2 cell line, nine were active toward *L. infantum* axenic amastigotes ( $7\ \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 25\ \mu\text{M}$ ) and thirteen were active against *T. brucei brucei* trypomastigotes ( $2\ \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 25\ \mu\text{M}$ ), molecule **24** being excluded from the analysis because of its lack of solubility. As a first approach, we wanted to see if there was a relationship between activity and lipophilicity. Computed LogP, ranging from 1.15 to 2.5 did not show any correlation, active molecules presenting either low (compound **2**) or high (compound **22**) LogP values.

We then explored the structure-activity relationships (SARs) of the pharmacophore by focusing on the influence of the redox potentials toward the activity against *L. infantum*. Indeed, on the basis that this nitroaromatic pharmacophore could be the substrate of parasitic nitroreductases, it first appeared important to understand which chemical criteria would make this pharmacophore suitable for being efficiently reduced into cytotoxic metabolites. The basic redox potential value of 8-nitroquinoline **1** (−0.84 V) and nitrobenzene (−0.85 V) are quite low and do not seem suitable for the catalytic capabilities of the parasitic nitroreductases (Fig. 2). On the contrary, when the lactam function is combined with the presence of a nitro group at position 8 (initial hit), a significant increase in the value of the redox potential, up to −0.54 V, is observed and the molecule turns active. When keeping the lactam function while moving the nitro group at position 6 or 5 (compounds **15** and **19**), redox potentials become lower and the IC<sub>50</sub> values of the molecules increased, resulting in a loss of activity against *L. infantum*. The same effect is noted with inactive *O*-methylated analog (compound **21**), which redox potential drastically fell to −0.93 V (Fig. 2). Finally, adding an amide function in the *ortho* position of the nitrogroup (compounds **3** and **5**) did not provide an optimal value of redox potential (−0.68 V and −0.86 V, respectively) resulting in poor antileishmanial activity of the compounds. Thus the 8-nitroquinolin-2-(1*H*)-one scaffold definitely appears to be the antileishmanial pharmacophore. Besides, as presented in the X-ray diffraction structures (Fig. 3), this pharmacophore presents a noticeable intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group at position 8, responsible for a +0.3 V increase in redox potentials, allowing antileishmanial activity.

Nevertheless, molecules **26** and **30**, which present the same redox potential, do not have the same antileishmanial activity (**26** being moderately active and **30** being inactive). By examining their LogP values (respectively 2.05 and 1.38) it could be hypothesized that antileishmanial activity depends on a compromise between redox potential values and lipophilicity.

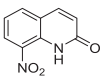


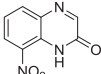
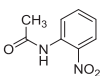
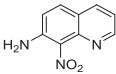
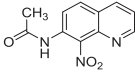
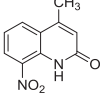
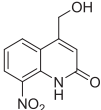
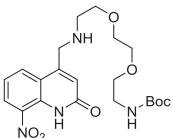
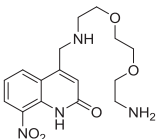
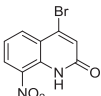
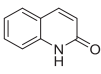
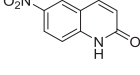
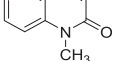
Contrary to what was observed in *Leishmania*, the anti-trypansomal activity did not depend on the redox potential values in the studied series, active molecules presenting either low (compound **15**) or high (compound **22**) redox potential values. It could be hypothesized that the enzymatic capabilities of the *T. brucei* NTR may be compatible with a broader spectrum of redox potentials than the ones of *L. donovani* NTR.

Optimization of redox potentials: computational and *in vitro* studies.

From this point, we investigated the antileishmanial pharmacomodulation of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one by introducing various substituents (or heteroatoms) at all positions of the scaffold and compared the effect of electron-donating and electron withdrawing groups, to gain access to new optimized derivatives. Our goal was to synthesize a series of derivatives presenting a large spectrum of redox potentials, not only to gain a better understanding of the electrochemical process, but also to define as precisely as possible the lowest redox potential value compatible with activity in the series. For that purpose instead of synthesizing molecules randomly, we used *ab initio* calculations to estimate the redox potential values of many hypothetical derivatives. Previous studies about the computation of reduction potentials of nitroaromatic derivatives showed that the results are very sensitive to the basis set applied. Diffuse s and p-type functions, combined with polarization functions were shown to be important for electron affinity calculations of nitrobenzenes [22,23]. Because accurate results were obtained with the Pople's 6-311++G basis set on several molecules for which computed potentials were compared to experimental ones, the 6-311++G (2 d, 2p) basis set was selected as a good compromise between accuracy and computational cost for reduction potential calculations. The hybrid M06-2x density functional was chosen for its accuracy to compute thermochemical parameters. The standard redox potentials were computed with the Faraday's law (see equation (1) in the experimental section) from the free energy of the one-electron reduction. Fig. 4 shows the correlation between the experimental and theoretical redox potentials. It can be seen that the slope of the correlation is close to 1.00 and the correlation coefficient (*r*) is 0.97. Therefore, this model was very efficient for predicting the standard redox potentials and was used to select the most appropriate compounds to be synthesized and evaluated.

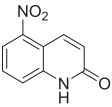
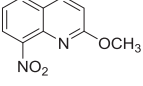
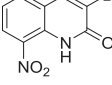
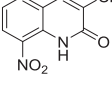
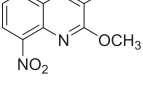
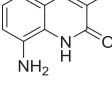
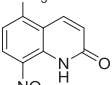
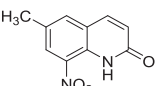
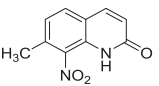
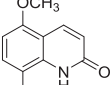
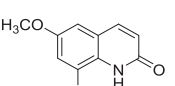
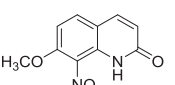
The studied series was completed with 11 derivatives of the pharmacophore presenting redox potentials ranging from −0.75 V to −0.45 V. Fig. 5 shows that introducing a heteroatom at position 4 of the scaffold (quinoxaline analog **2**) or a halogen atom at position 3 (compounds **22** and **23**) increased the redox potential values by about +0.1 V, the corresponding molecules being active against *L. infantum*. When modifying the pyridinone moiety by introducing a methyl group or a bromine atom at position 4 (compounds **7** and **13**, respectively), the redox potential almost remained unchanged and the molecules were active. By substituting the benzene moiety with a methyl group at position 5 or 6 (compounds **26** and **27**), the redox potentials decreased slightly (down to −0.58 V) and the molecules, were less efficient (IC<sub>50</sub> ≈ 25 μM). Compounds bearing a methoxy group at positions 5, 6 or 7 (compounds **29–31**) or a methyl group at position 7 (compound **28**) showed lower redox potentials, varying from −0.58 V to −0.75 V, and were totally inactive (IC<sub>50</sub> > 100 μM). Thus, in this series, it can be noted that the optimal redox potential value to target in order to obtain

**Table 1**  
Reduction potentials, calculated LogP, anti-kinetoplastid activity and cytotoxicity of the synthesized nitroaromatic compounds **1–31**.

Molecule	Structure	E° (V/ NHE) <sup>a</sup>	LogP <sup>b</sup>	<i>L. infantum</i> axenic amastigote IC <sub>50</sub> (μM)	<i>T. brucei brucei</i> trypomastigote IC <sub>50</sub> (μM)	HepG2 Cytotoxicity CC <sub>50</sub> (μM)
<b>Initial hit</b>		- 0.54	1.54	15.5 ± 0.5	23.4 ± 5.7	164 ± 28
<b>Nitro-benzene (NB)</b>		- 0.85	1.91	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>1</b>		- 0.84	2.07	>100 <sup>d</sup>	17.9 ± 1.8	>100 <sup>d</sup>
<b>2</b>		- 0.46	1.2	11.0 ± 2.1	7.3 ± 0.8	125 ± 19
<b>3</b>		- 0.68	1.15	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>4</b>		- 1.1	1.89	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>5</b>		- 0.86 <sup>c</sup>	1.31	>100 <sup>d</sup>	10.8 ± 1.4	>100 <sup>d</sup>
<b>7</b>		- 0.53	2.05	10.2 ± 1.0	20.9 ± 8.9	110 ± 9
<b>9</b>		—	—	23.4 ± 4.8	38.3 ± 6.1	>100 <sup>d</sup>
<b>10</b>		—	—	>100 <sup>d</sup>	2.5 ± 1.8	>100 <sup>d</sup>
<b>11</b>		—	—	>100 <sup>d</sup>	7.6 ± 1.8	>100 <sup>d</sup>
<b>13</b>		- 0.51	1.86	20.3 ± 5.0	5.5 ± 1.3	60 ± 2
<b>14</b>		- 1.86 <sup>b</sup>	—	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>15</b>		- 0.82	1.54	>100 <sup>d</sup>	2.3 ± 0.6	>100 <sup>d</sup>
<b>16</b>		—	—	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>

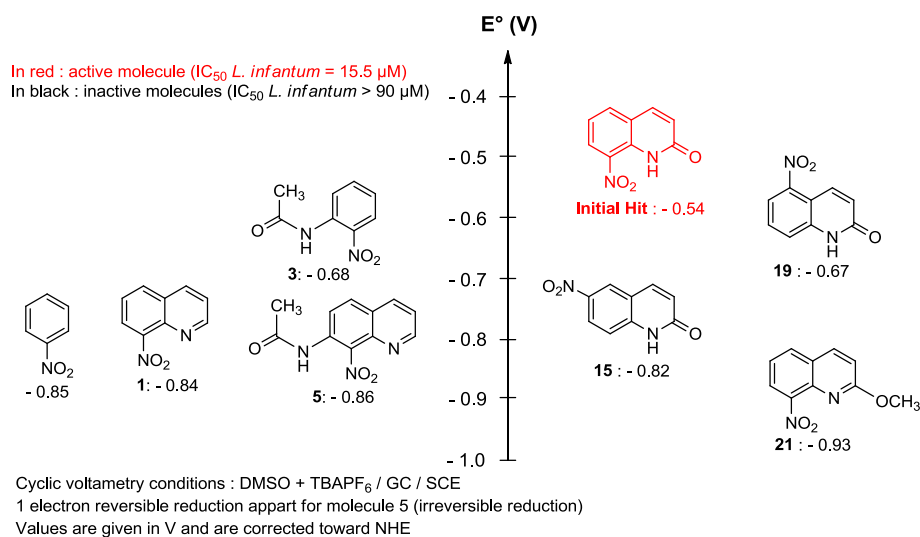
(continued on next page)

Table 1 (continued)

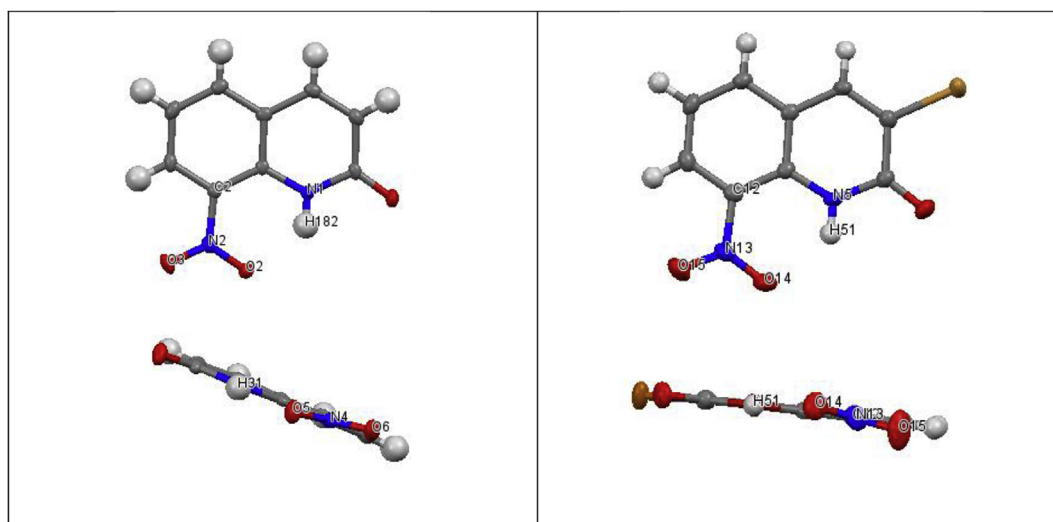
Molecule	Structure	E° (V/ NHE) <sup>a</sup>	LogP <sup>b</sup>	<i>L. infantum</i> axenic amastigote IC <sub>50</sub> (μM)	<i>T. brucei brucei</i> trypomastigote IC <sub>50</sub> (μM)	HepG2 Cytotoxicity CC <sub>50</sub> (μM)
<b>19</b>		- 0.67	1.54	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>21</b>		- 0.93	2.51	88.8 ± 13.0	28.5 ± 8.1	>100 <sup>d</sup>
<b>22</b>		- <b>0.45</b>	<b>2.36</b>	<b>7.1 ± 1.5</b>	<b>1.9 ± 0.4</b>	<b>92 ± 13</b>
<b>23</b>		- 0.47	2.2	16.0 ± 0.9	1.2 ± 0.2	85 ± 4
<b>24</b>		- 0.86	—	>6.2 <sup>e</sup>	0.4 ± 0.1	>6.2 <sup>e</sup>
<b>25</b>		—	—	>50 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>26</b>		- 0.58	2.05	25.2 ± 3.7	29.1 ± 4.7	>100 <sup>d</sup>
<b>27</b>		- 0.56	2.05	23.0 ± 5.0	2.1 ± 0.8	>100 <sup>d</sup>
<b>28</b>		- 0.71	2.05	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>29</b>		- 0.65	1.38	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>30</b>		- 0.58	1.38	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>31</b>		- 0.75	1.38	>100 <sup>d</sup>	>50 <sup>d</sup>	>100 <sup>d</sup>
<b>Doxorubicin<sup>f</sup></b>		—	—	—	—	0.2 ± 0.02
<b>Amphotericin B<sup>g</sup></b>		—	—	0.06 ± 0.001	—	5.5 ± 0.25
<b>Miltefosine<sup>g</sup></b>		—	—	0.8 ± 0.2	—	85 ± 8.8
<b>Fexinidazole<sup>g,h</sup></b>		—	—	3.4 ± 0.8	0.4 ± 0.2	>200 <sup>c</sup>
<b>Suramin<sup>h</sup></b>		—	—	—	0.02 ± 0.009	>100 <sup>c</sup>
<b>Eflornithine<sup>h</sup></b>		—	—	—	15.8 ± 2.1	>100 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Cyclic voltammetry conditions: DMSO/TBAPF<sub>6</sub>, SCE/GC, 1 electron reversible reduction, values are given in V versus NHE.<sup>b</sup> Weighted logP were computed with Marvin<sup>®</sup> (ChemAxon).<sup>c</sup> Irreversible reduction.<sup>d</sup> The IC<sub>50</sub> or CC<sub>50</sub> value was not reached at the highest tested concentration.<sup>e</sup> The product could not be tested at higher concentrations due to a poor solubility in aqueous medium.<sup>f</sup> Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug.<sup>g</sup> Amphotericin B, Miltefosine and Fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs.<sup>h</sup> Fexinidazole, Suramin and Eflornithine were used as anti-*Trypanosoma brucei* reference drugs.

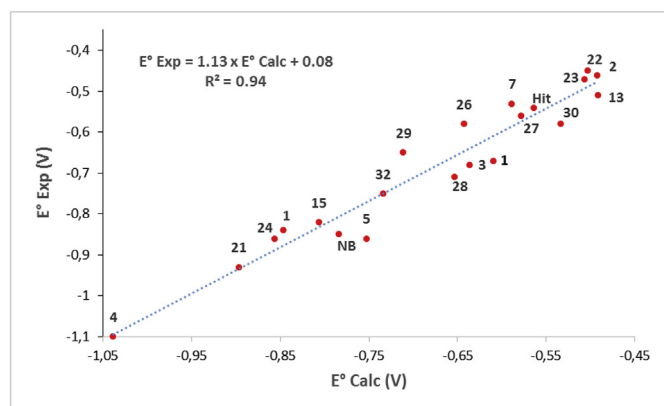




**Fig. 2.** The 8-nitroquinolin-2(1H)-one pharmacophore presented a characteristic high redox potential value.



**Fig. 3.** X-ray structures of initial hit and new hit **22** presenting an intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group (Initial hit: N-H distance = 0.89 Å, H-O distance = 2.01 Å, N-H-O angle = 129°; Hit **22**: N-H distance = 0.84 Å, H-O distance = 2.01 Å, N-H-O angle = 131°).

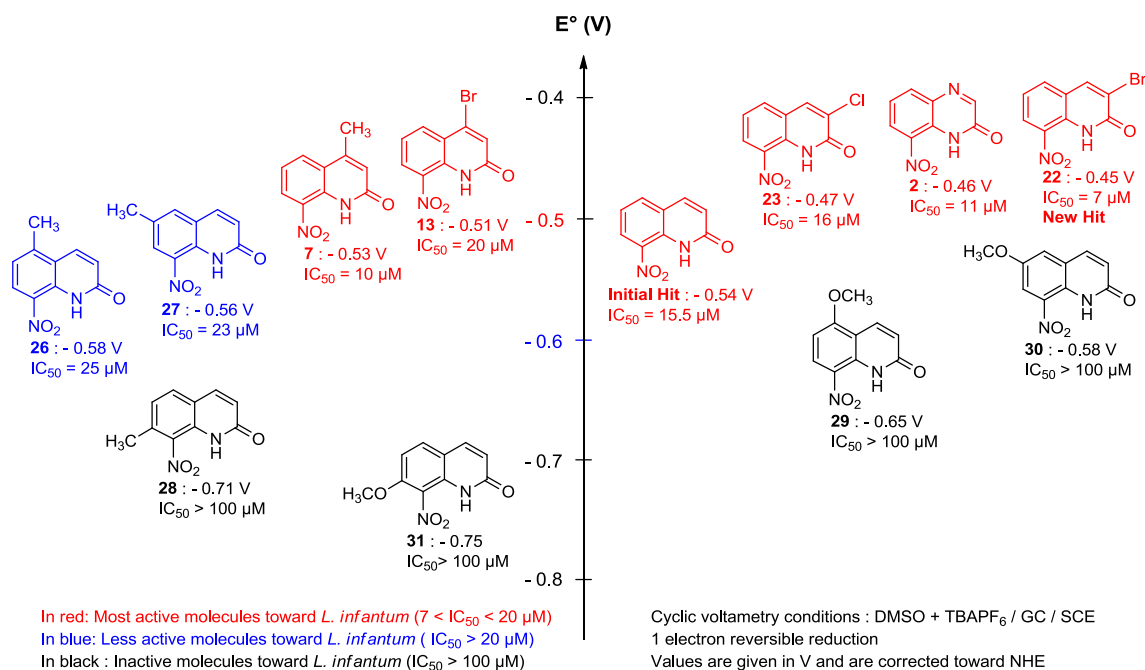


**Fig. 4.** Correlation between theoretical and experimental standard redox potential of nitroquinolines.

antileishmanial activity is  $-0.5$  V and that molecules whose redox potential is positioned below  $-0.6$  V lost all activity.

Among all synthesized compounds, derivative **22** was highlighted as a new hit (Table 1). It is not only active against *L. infantum* ( $IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$ ), but also against *T. brucei brucei* ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$ ), which was not the case of the initial hit, displaying modest activity ( $IC_{50} = 23.4 \mu\text{M}$ ) toward the latter parasite. For comparison with the anti-leishmanial reference drugs, hit compound **22** appears much less active than amphotericin B and about 10 times less active than miltefosine (with equivalent cytotoxicity). Regarding anti-HAT drugs, hit compound **22** appears much less active than suramin, but more active than eflornithine. It is also important to compare hit molecule **22** with drug candidate fexinidazole, as they both belong to the nitroaromatic family: **22** is about 2 times more cytotoxic and, depending on the parasite, between 2 and 5 times less active than this drug candidate, which remains interesting for a hit-compound. It was then necessary to evaluate the *in vitro* activity of **22** against the amastigote stage of *Leishmania* in an intramacrophage model, closer to the *in vivo* situation. As presented in





**Fig. 5.** Modulation of the redox potential of the 8-nitroquinolin-2 [1H]-one pharmacophore. Mode of action studies, genotoxicity evaluation and preliminary pharmacokinetic properties of **22**.

Table 2, the test was done on *L. donovani*, the other species responsible for VL. Hit molecule **22**, displays a low cytotoxicity on the THP1 macrophage cell line (CC<sub>50</sub> = 72 μM) and is about 3 times less active (IC<sub>50</sub> = 18 μM) on this intramacrophage amastigote *in vitro* model than miltefosine (IC<sub>50</sub> = 5.4 μM). Fexinidazole is not active on the intramacrophage amastigote stage (IC<sub>50</sub> > 50 μM) as it first needs to be metabolized into a sulfone derivative [24]. Finally, as expected, compound 14 (non nitrated) and **25** (8-amino derivative), negative controls deriving from hit **22**, did not display any antiparasitic activity.

In order to assess whether this compound series was a substrate

**Table 2**  
Complementary *in vitro* biological evaluations done on hit compound **22**.

<i>In vitro</i> studies	Compound <b>22</b>
Cytotoxicity: CC <sub>50</sub> THP1 (μM) <sup>a</sup>	72 ± 6
IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> intramacrophagic amastigotes (μM) <sup>b</sup>	18 ± 2
IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigotes wild type strain (μM)	5.9 ± 0.12
IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigotes NTR1 over-expressing strain (μM)	0.47 ± 0.02
IC <sub>50</sub> <i>L. donovani</i> promastigotes NTR2 over-expressing strain (μM)	4.6 ± 0.12
IC <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypomastigotes wild type strain (μM)	17.7 ± 1.0
IC <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypomastigotes NTR1 over-expressing strain (μM)	3.9 ± 0.1
Microsomal stability: T <sub>1/2</sub> (min)	>40
Binding % to human albumin	92

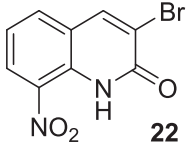
<sup>a</sup> Reference compounds: Amphotericin B CC<sub>50</sub> = 3.6 ± 0.7 μM; Miltefosine CC<sub>50</sub> > 40 μM; Fexinidazole CC<sub>50</sub> > 62.5 μM.

<sup>b</sup> Reference compounds: Amphotericin B IC<sub>50</sub> = 0.4 μM; Miltefosine IC<sub>50</sub> = 5.4 μM; Fexinidazole IC<sub>50</sub> > 50 μM.

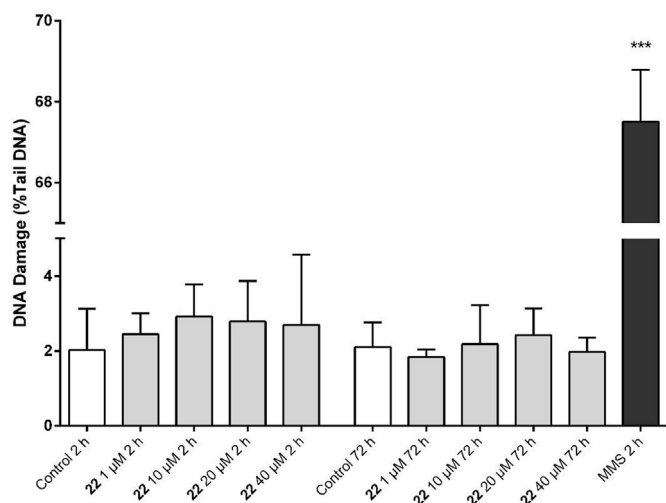
of parasitic NTRs, the hit compound **22** was assayed against a wild type strain of *L. donovani* promastigotes and two strains over-expressing NTR1 [25] and NTR2 [26], respectively (Table 2). Compound **22** was ten times more effective against the strain over-expressing NTR1 (IC<sub>50</sub> = 0.47 μM) vs WT and NTR2 strains, indicating that it is selectively bioactivated by NTR1 of *L. donovani*. Interestingly, this is the same type 1 nitroreductase that bio-activates fexinidazole and its metabolites [25]. Following the same approach in *T. brucei brucei*, it was also demonstrated that type 1 NTR, the unique NTR enzyme expressed in this parasite, was responsible for the bioactivation of **22** (Table 2).

Nitroaromatic drugs are often suspected to be mutagenic or genotoxic, which has considerably limited the development of such derivatives in the past decades [27]. The most famous *in vitro* test used for evaluating mutagenicity is the Ames test, using *Salmonella typhimurium* strains. Nevertheless, considering that *Salmonella* bacteria possess nitroreductases [28], the Ames test is usually positive when evaluating nitroaromatics, with no real predicting character for humans, considering that there are no NTRs in mammalian cells and that most of nitroaromatic derivatives only exert a genotoxic character after being bioactivated into reduced metabolites [27]. For that reason, it is nowadays accepted that the comet assay or the micronucleus assay are better *in vitro* tools for evaluating the potential genotoxicity of nitroaromatics [27]. Indeed, metronidazole, one of the most famous anti-infective nitroheterocycles on the market, is mutagenic in the Ames test, but not genotoxic in the comet assay [29] and fexinidazole is not genotoxic in the micronucleus assay despite being mutagenic in the Ames test [24]. Regarding compound **22**, the Ames test (in metabolizing conditions) and the comet assay were done in parallel and revealed that, although being mutagenic in the Ames test (Table 3) at 0.25 or 2.5 mM, compound **22** was not genotoxic in the comet assay after 2 or 72 h of exposure, at 1, 10, 20 or 40 μM (Fig. 6), concentrations chosen from the HepG2 CC<sub>10</sub>% (40 μM). This lack of genotoxicity is a key point when thinking about further development of this pharmacophore. Finally, preliminary *in vitro* pharmacokinetic evaluations were done with compound **22** (Table 2). It presented a very

**Table 3**  
Ames test results for hit compound **22**.

 <chem>O=C1C=C(Br)C2=CC=CC=C2N1[N+](=O)[O-]</chem> <b>22</b>		
	0.25 mM	2.5 mM
TA97a + S9 mix	Positive	Positive
TA98 + S9 mix	Positive	Positive
TA100 + S9 mix	Positive	Positive
TA102 + S9 mix	Negative	Positive

Benzo [a]pyrene was used as a positive control.

**Fig. 6.** Results of the comet assay for hit compound **22**.  
Positive control = MMS = 1 mM methylmethanesulfonate.

good microsomal stability ( $T_{1/2} > 40$  min) and had a strong, but not extreme binding to human albumin (92%), in relation with the relatively high value of its calculated  $\log P$  (= 2.36).

#### 4. Conclusion

Starting from the previously identified 8-nitroquinolin-2(1H)-one antileishmanial pharmacophore, an electrochemistry-guided SAR study revealed that an intramolecular hydrogen bond between the lactam ring and the nitro group is responsible for a +0.3 V increase in the redox potential value (compared with 8-nitroquinoline) resulting in improved antileishmanial activity. A computational model allowed the prediction of the redox potential values of any derivative belonging to this series, and we synthesized a set of derivatives presenting a large range of redox potential values. Then, it was highlighted that, to be active, molecules belonging to this series must display a redox potential value of about −0.5 V and that molecules with a redox potential below −0.6 V were inactive. By introducing electron-withdrawing groups on the pyridone moiety of the scaffold, a new original hit compound was found: **22**. Presenting a low cytotoxicity on the human HepG2 cell line ( $CC_{50} = 92 \mu\text{M}$ ), it displays activity toward *L. infantum* axenic amastigotes ( $IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$ ), *L. donovani* promastigotes ( $IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ ) and *L. donovani* intramacrophagic amastigotes ( $IC_{50} = 18 \mu\text{M}$ ), but also toward *T. brucei brucei* ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{M}$ ). Moreover, we demonstrated that **22** was not genotoxic in the comet assay and that it was selectively bioactivated by

the mitochondrial NTR1 of *L. donovani* and *T. brucei brucei*. This whole study, completed with two encouraging preliminary *in vitro* pharmacokinetic parameters (good microsomal stability and 92% binding to human albumin) now opens the way to the rational conception, guided with  $E^\circ$  values, of new efficient, selective and safe NTR1 bioactivated 8-nitroquinolin-2(1H)-ones against VL and HAT.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### Acknowledgments

A. Fairlamb and S. Wyllie are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). J. Pedron thanks the Université Paul Sabatier de Toulouse and the Région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée for PhD funding. C. Piveteau from Institut Pasteur de Lille, C. Bijani from Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse and the mass spectrometry team of the Institut de Chimie de Toulouse are also acknowledged for their support, respectively for pharmacokinetics, NMR and HRMS experiments.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.001>.

#### Abbreviations

NTR	Nitroreductase
SAR	Structure-Activity Relationship
rt	room temperature
NBS	N-bromosuccinimide
AIBN	Azobisisobutyronitrile
THF	Tetrahydrofuran
MW	Microwaves
DMF	N,N-Dimethylformamide
Ar.	Argon
NHE	Normal Hydrogen Electrode
$IC_{50}$	half maximal inhibitory concentration
$CC_{50}$	half maximal cytotoxic concentration
TBAPF6	Tetrabutylammonium hexafluorophosphate;
SCE	Saturated Calomel Electrode
GC	Glassy Carbon
$E^\circ$	standard redox potential
$E^\circ_{\text{exp}}$	standard experimental redox potential
$E^\circ_{\text{calc}}$	standard calculated redox potential
HRMS	High-resolution mass spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
VL	Visceral leishmaniasis
HAT	Human African Trypanosomiasis.

#### Experimental section

##### Chemistry

All reagents and solvents were obtained from commercial sources (Fluorochem<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> or Alfa Aesar<sup>®</sup>) and used as received. The progress of the reactions was monitored by pre-coated thin layer chromatography (TLC) sheets ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> from Macherey-Nagel and were visualized by ultraviolet light at 254 nm. The NMR <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra were recorded on a Bruker UltraShield 300 MHz, a Bruker IconNMR 400 MHz, or a Bruker Avance NEO 600 MHz instrument, at the Laboratoire de

Chimie de Coordination and data are presented as follows: chemical shifts in parts per million ( $\delta$ ) using tetramethylsilane (TMS) as reference, coupling constant in Hertz (Hz), multiplicity by abbreviations: (s) singlet, (d) doublet, (t) triplet, (q) quartet, (dd) doublets of doublets, (m) multiplet and (br s) broad singlet. Melting points are uncorrected and were measured on a Stuart Melting Point SMP3 instrument. HRMS measurements were done on a GCT Premier Spectrometer (DCI,  $\text{CH}_4$ , HRMS) or Xevo G2 QTOF (Waters, ESI+, HRMS) instrument at the Université Paul Sabatier, Toulouse. Microwave reactions were realized in a CEM Discover® microwave reactor. All products were purified by chromatography columns and then recrystallized. Purity of the products was determined by  $^1\text{H}$  NMR.

General procedure for the preparation of 8-nitroquinoline 1 [30], 7-amino-8-nitroquinoline 4 [31], 2-chloro-4-methyl-8-nitroquinoline 6 [32], 2,4-dibromo-8-nitroquinoline 12 [17], 6-nitroquinolin-2(1H)-one 15 [16], 2-chloro-5-nitroquinoline 17 [16] and 2-chloro-8-nitroquinoline 18 [16]:

$\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%) was added onto 1 equiv. of the quinoline derivatives, cooled with an ice bath. 5 equiv. of 65%  $\text{HNO}_3$  were then added dropwise at  $0^\circ\text{C}$  and the reaction mixture was stirred at rt for 1–4 h. The reaction mixture was successively poured into ice, neutralized with NaOH and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using adapted eluent and recrystallized if necessary to give compounds 1, 4, 6, 12, 15, 17 and 18.

8-nitroquinoline 1 ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent, separated from its 5-nitro isomer and isolated to yield a pale yellow solid (35%, 2.7 mmol, 470 mg), mp  $90^\circ\text{C}$  (Lit:  $90^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.53–7.66 (m, 2H), 8.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.27 (dd,  $J = 1.6$  and 8.4 Hz, 1H, H7), 9.70 (dd,  $J = 1.7$  and 4.2 Hz, 1H, H2).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122.8 (CH), 123.8 (CH), 125.3 (CH), 129.0 (C), 132.0 (CH), 136.1 (CH), 139.5 (C), 148.2 (C), 152.6 (CH).

7-amino-8-nitroquinoline 4 ( $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (80/20) as an eluent and isolated to yield an orange solid (46%, 0.16 mmol, 30 mg), mp  $193^\circ\text{C}$  (Lit:  $194^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.61 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.00 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H6), 7.28 (dd, 1H,  $J = 4.4$  and 8.1 Hz, H3), 7.69 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H5), 8.00 (dd, 1H,  $J = 1.8$  and 8.1 Hz, H4), 8.92 (dd, 1H,  $J = 1.8$  and 4.4 Hz, H2).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, Acetone  $d_6$ ): 118.90 (CH), 119.8 (CH), 120.9 (C), 131.8 (CH), 135.7 (CH), 139.7 (C), 142.8 (C), 143.1 (C), 151.2 (CH).

2-chloro-4-methyl-8-nitroquinoline 6 ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (70/30) as an eluent, separated from its 6-nitro isomer, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a white solid in (53%, 14.8 mmol, 3.3 g), mp  $143^\circ\text{C}$  (Lit:  $142$ – $143^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.74 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.35 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H3), 7.62–7.66 (m, 1H, H6), 8.00 (dd,  $J = 7.6$  and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.18 (dd,  $J = 8.4$  and 1.3 Hz, 1H, H7).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 18.9 ( $\text{CH}_3$ ), 124.2 (CH), 124.5 (CH), 125.4 (CH), 127.8 (CH), 127.9 (C), 138.9 (C), 147.8 (C), 147.9 (C), 153.2 (C).

2,4-dibromo-8-nitroquinoline 12 ( $\text{C}_9\text{H}_4\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (9/1) as an eluent and isolated to yield a white solid (56%, 6 mmol, 2 g), mp  $129^\circ\text{C}$  (Lit:  $129^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.72–7.76 (m, 1H, H6), 8.00 (s, 1H, H3), 8.08 (dd,  $J = 7.6$  et 1.4 Hz, 1H, H5), 8.39 (dd,  $J = 8.5$  et 1.4 Hz 1H, H7).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$ : 125.3 (CH), 126.9 (CH), 127.5 (C), 130.9 (CH), 131.0 (CH), 135.0 (C), 139.7 (C), 143.6 (C), 147.5 (C).

6-nitroquinolin-2(1H)-one 15 ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$ ) was recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (91%, 6.3 mmol, 1.2 g), mp  $279^\circ\text{C}$

(Lit:  $279^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.68 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H3), 7.43 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H8), 8.12 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H4), 8.33 (dd,  $J = 2.6$  and 9.0 Hz, 1H, H7), 8.70 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H5), 12.3 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 116.3 (CH), 118.7 (C), 124.0 (CH), 124.5 (CH), 125.3 (CH), 140.3 (CH), 141.7 (C), 143.5 (C), 162.1 (C).

2-chloro-5-nitroquinoline 17 ( $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (8/2) as an eluent, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (14%, 4.3 mmol, 0.9 g), mp  $134^\circ\text{C}$  (Lit:  $133$ – $134^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.63 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H4), 7.82–7.87 (m, 1H, H7), 8.34 (dd,  $J = 8.6$  and 0.7 Hz, 1H, H8), 8.40 (dd,  $J = 7.6$  and 1.2 Hz, 1H, H6), 8.99 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H3).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 120.1 (C), 125.0 (CH), 125.6 (CH), 129.0 (CH), 135.1 (CH), 135.7 (CH), 145.6 (C), 148.2 (C), 152.6 (C).

2-chloro-8-nitroquinoline 18 ( $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (8/2) as an eluent, isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (50%, 15.3 mmol, 3.2 g), mp  $152^\circ\text{C}$  (Lit:  $152^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.56 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H4), 7.65–7.69 (m, 1H, H6), 8.07 (dd,  $J = 8.3$  and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.11 (dd,  $J = 7.6$  and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.23 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H3).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 124.6 (CH), 124.9 (CH), 125.8 (CH), 127.6 (C), 131.8 (CH), 138.6 (CH), 139.0 (C), 147.1 (C), 153.6 (C).

#### Preparation of 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one 2

Ethanol (25 mL) was added onto 1 g of 3-nitro-1,2-phenylenediamine (6.53 mmol, 1 equiv.). 0.6 g of glyoxylic acid monohydrate (6.53 mmol, 1 equiv.) was then added at rt and the reaction mixture was stirred at  $80^\circ\text{C}$  for 6 h. The reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/diethyl ether (80/20) as an eluent. 8-nitroquinoxalin-2(1H)-one 2 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield an orange solid (46%, 2.98 mmol, 570 mg).

Compound 2 ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3$ ): mp  $162^\circ\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.45–7.50 (m, 1H, H6), 8.25 (dd,  $J = 1.5$  and 8.2 Hz, 1H, H5), 8.39 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, H3), 8.55 (dd,  $J = 1.5$  and 8.2 Hz, 1H, H7), 11.37 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122.6 (CH), 127.8 (C), 128.0 (CH), 133.1 (C), 133.8 (C), 137.4 (CH), 152.6 (CH), 153.6 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  192.0409, found 192.0412.

#### Preparation of N-(2-Nitrophenyl)-acetamide 3 [33]

Acetic acid (25 mL) was added onto 525 mg of 2-nitroaniline (3.8 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at  $120^\circ\text{C}$  and 720  $\mu\text{L}$  of acetic anhydride (7.6 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. After 3 h under reflux, the reaction mixture was poured into ice, neutralized with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. N-(2-Nitrophenyl)-acetamide 3 was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (87%, 3.3 mmol, 604 mg).

Compound 3 ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ): mp  $93^\circ\text{C}$  (Lit:  $92$ – $94^\circ\text{C}$ ),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.29 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.16–7.20 (m, 1H, H4), 7.63–7.67 (m, 1H, H5), 8.21 (dd,  $J = 8.5$  and 1.3 Hz, 1H, H6), 8.77 (dd,  $J = 8.6$  and 1.3 Hz, 1H, H3), 10.33 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25.60 ( $\text{CH}_3$ ), 122.2 (CH), 123.2 (CH), 125.7 (CH), 134.8 (C), 135.9 (CH), 136.3 (C), 169.0 (C).

### Preparation of 7-acetylamino-8-nitroquinoline 5

Glacial acetic acid (20 mL) was added onto 60 mg of 7-amino-8-nitroquinoline (0.32 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 120 °C and 180  $\mu$ L of acetic anhydride (1.6 mmol, 6 equiv.) were added dropwise. After 24 h under reflux, the reaction mixture was poured into ice, neutralized with  $K_2CO_3$  and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (90/10) as an eluent. 7-acetylamino-8-nitroquinoline 5 was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (53%, 0.17 mmol, 39 mg).

Compound 5 ( $C_{11}H_9N_3O_2$ ): mp 189 °C,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.28 (s, 3H,  $CH_3$ ), 7.49 (dd,  $J = 4.3$  et 8.3 Hz, 1H, H3), 7.96 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz, H6), 8.19 (dd,  $J = 1.7$  et 8.3 Hz, 1H, H4), 8.35 (br s, 1H, NH), 8.54 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H5), 8.99 (dd,  $J = 1.7$  et 4.3 Hz, 1H, H2).  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 25.0 ( $CH_3$ ), 121.7 (CH), 121.9 (CH), 125.2 (C), 127.8 (C), 131.4 (CH), 131.8 (C), 135.8 (CH), 140.3 (C), 152.6 (CH), 168.7 (C). HRMS (DCI  $CH_4$ ) calcd for  $C_{11}H_9N_3O_2$   $[M+H]^+$  232.0722, found 232.0719.

General procedure for the preparation of 4-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 7 [34], quinolin-2(1H)-one 14 [35], 5-nitroquinolin-2(1H)-one 19 [16] and 8-nitroquinolin-2(1H)-one 20 [16].

Acetonitrile (25 mL) and 70% perchloric acid solution (25 mL) were added onto 1 equiv. of the quinoline derivatives. The reaction mixture was stirred at 100 °C overnight. The reaction mixture was then poured into ice, neutralized with KOH and extracted twice with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residues were purified by chromatography on silica gel using adapted eluent and recrystallized if necessary to give compounds 7, 14, 19, 20.

4-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 7 ( $C_{10}H_8N_2O_3$ ) was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (92%, 11 mmol, 2.2 g), mp 203 °C (Lit: 196 °C),  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 3.33 (s, 3H,  $CH_3$ ), 6.63 (s, 1H, H3), 7.39–7.44 (m, 1H, H6), 8.19 (dd,  $J = 8.0$  and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.42 (dd,  $J = 8.4$  and 1.6 Hz, 1H, H7), 10.98 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (DMSO, 100 MHz)  $\delta$ : 19.6 ( $CH_3$ ), 121.6 (CH), 122.0 (CH), 122.6 (C), 127.9 (CH), 133.1 (CH), 133.6 (C), 134.6 (C), 148.9 (C), 161.0 (C). quinolin-2(1H)-one 14 ( $C_9H_7NO$ ) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (8/2) as an eluent and isolated to yield a white solid (74%, 22.7 mmol, 3.3 g), mp 198 °C (Lit: 193 °C),  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.72 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H3), 7.20–7.25 (m, 1H, H6), 7.40–7.42 (m, 1H, H5), 7.50–7.54 (m, 1H, H7), 7.56–7.58 (m, 1H, H8), 7.82 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H4), 11.97 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 116.3 (CH), 119.9 (C), 121.3 (CH), 122.7 (CH), 127.7 (CH), 130.7 (CH), 138.5 (C), 141.1 (CH), 164.7 (C).

5-nitroquinolin-2(1H)-one 19 ( $C_9H_6N_2O_3$ ) was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (92%, 2.2 mmol, 418 mg), mp 302 °C (Lit: 302 °C),  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6.76 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, H3), 7.65–7.73 (m, 2H, H7 H8), 7.88 (dd,  $J = 7.7$  and 1.3 Hz, 1H, H6), 8.25 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, H4), 12.3 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 111.9 (C), 118.9 (CH), 121.5 (CH), 125.8 (CH), 130.6 (CH), 134.7 (CH), 140.7 (C), 146.7 (C), 161.3 (C).

8-nitroquinolin-2(1H)-one 20 ( $C_9H_6N_2O_3$ ) was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a yellow solid (96%, 10.6 mmol, 2.02 g), mp 163 °C (Lit: 163 °C),  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.79 (dd,  $J = 9.7$  and 2.0 Hz, 1H, H3), 7.32–7.36 (m, 1H, H6), 7.82 (d,  $J = 9.7$  and 1.4 Hz, 1H, H4), 7.91 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H5), 8.53 (dd,  $J = 8.4$  and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.3 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 121.4 (CH), 122.1 (C), 123.8 (CH), 127.9 (CH),

133.1 (C), 133.9 (C), 135.6 (CH), 139.9 (CH), 161.6 (C).

### Preparation of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 8

Carbon tetrachloride (15 mL) was added onto 400 mg of 4-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one (1.9 mmol, 1 equiv.) and 1.7 g of *N*-bromosuccinimide (9.7 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was heated at 80 °C. Thent 31 mg of AIBN (0.24 mmol, 0.1 equiv.) were added, and stirred overnight. The reaction mixture was poured into water, extracted twice with dichloromethane and once with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using ethyl acetate as an eluent. 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 8 was isolated to yield a yellow solid (21%, 0.42 mmol, 120 mg).

Compound 8 ( $C_{10}H_7BrN_2O_3$ ): mp 161 °C,  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4.60 (s, 2H,  $CH_2$ ), 6.87 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H3), 7.40–7.44 (m, 1H, H6), 8.18 (dd,  $J = 1.3$  and 8.8 Hz, 1H, H5), 8.57 (dd,  $J = 1.3$  and 8.3 Hz, 1H, H7), 11.44 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 27.9 ( $CH_2$ ), 120.2 (C), 121.3 (CH), 123.7 (CH), 128.4 (CH), 132.4 (CH), 133.6 (C), 134.4 (C), 146.1 (C), 160.7 (C). HRMS (DCI  $CH_4$ ) calcd for  $C_{10}H_8BrN_2O_3$   $[M+H]^+$  282.9718, found 282.9723.

### Preparation of 4-hydroxymethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 9

Fifty milliliters of a mixture  $H_2O/THF$  (1/1) were added onto 150 mg of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one (0.53 mmol, 1 equiv.). 106 mg of NaOH (2.6 mmol, 5 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred at 50 °C for 24 h. The reaction mixture was then poured into water, extracted twice with dichloromethane and twice with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using ethyl acetate as an eluent. 4-hydroxymethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 9 was isolated to yield a yellow solid (43%, 0.23 mmol, 50 mg).

Compound 9 ( $C_{10}H_8N_2O_4$ ): mp 211 °C,  $^1H$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$ : 4.80 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 5.67 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, OH), 6.73 (s, 1H, H3), 7.37–7.42 (m, 1H, H6), 8.13 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H5), 8.42 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H7), 11.01 (br s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO)  $\delta$ : 39.5 ( $CH_2$ ), 122.0 (CH), 122.1 (C), 123.0 (CH), 128.2 (CH), 133.3 (CH), 133.8 (CH), 136.5 (C), 141.3 (C), 161.6 (C). HRMS (DCI  $CH_4$ ) calcd for  $C_{10}H_9N_2O_4$   $[M+H]^+$  221.0562, found 221.0558.

### Preparation of 4-[[2-(*N*-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 10

THF (50 mL) was added onto 500 mg of 4-bromomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one (1.8 mmol, 1 equiv.) and 1.3 g of *N*-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)-diethylamine (5.3 mmol, 3 equiv.). Triethylamine (375  $\mu$ L, 2.7 mmol, 1.5 equiv.) were then added and the reaction mixture was stirred at 50 °C overnight. The reaction mixture was evaporated *in vacuo*. The crude product was then resublimized in ethyl acetate, washed three times with water, dried over anhydrous  $MgSO_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether/methanol/20% aqueous ammonia solution (8.9/1/0.1) as an eluent. 4-[[2-(*N*-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one 10 was isolated to yield an orange oil (84%, 1.5 mmol, 680 mg).

Compound 10 ( $C_{21}H_{30}N_4O_7$ ):  $^1H$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$ : 1.36 (s, 9H, *t*Bu), 2.5 (s, 1H, NH amine), 2.75–2.77 (m, 2H,  $CH_2$  3'), 3.03–3.06 (m, 2H,  $CH_2$  10'), 3.36–3.39 (m, 2H,  $CH_2$  4'), 3.51–3.54 (m, 6H, 3x $CH_2$  6' 7' 9'), 4.02 (s, 2H,  $CH_2$  1'), 6.73 (br s, 1H, NH carbamate), 6.76 (s, 1H, H3), 7.38–7.42 (m, 1H, H6), 8.31 (dd,  $J = 8.1$



and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.42 (dd,  $J = 8.1$  and 1.3 Hz, 1H, H7), 11.03 (br s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO)  $\delta$ : 28.7 (3 CH<sub>3</sub>, tBu), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 48.7 (CH<sub>2</sub>), 49.9 (CH<sub>2</sub>), 69.6 (CH<sub>2</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 70.1 (CH<sub>2</sub>), 70.5 (CH<sub>2</sub>), 78.0 (C), 120.5 (CH), 121.4 (C), 121.6 (CH), 127.8 (CH), 132.9 (CH), 133.6 (C), 134.5 (C), 150.6 (C), 156.0 (C), 161.1 (C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 450.2114, found 450.2118.

#### Preparation of 4-[[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **11**

Hydrochloric acid (15 mL of 5 N HCl in isopropanol) was added onto 600 mg of 4-[[2-(*N*-boc-2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one (1.33 mmol, 1 equiv.) and the reaction mixture was then stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was successively poured into water, neutralized with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted several times with dichloromethane. The organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. 4-[[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]aminomethyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **11** was isolated to yield an oil in (43%, 0.57 mmol, 200 mg).

Compound **11** (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 2.5 (s, 1H, NH amine), 2.63–2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 10'), 2.74–2.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 3'), 3.35–3.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 9'), 3.49–3.55 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub> 4' 6' 7'), 4.01 (d,  $J = 1.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub> 1'), 6.76 (br s, 1H, H3), 7.38–7.42 (m, 1H, H6), 8.30 (dd,  $J = 8.1$  and 1.3 Hz, 1H, H5), 8.40 (dd,  $J = 8.1$  and 1.3 Hz, 1H, H7), 11.0 (br s, 1H, NH lactame).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO)  $\delta$ : 41.7 (CH<sub>2</sub>), 48.7 (CH<sub>2</sub>), 50.0 (CH<sub>2</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 70.1 (CH<sub>2</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>), 73.2 (CH<sub>2</sub>), 120.4 (CH), 121.4 (C), 121.5 (CH), 127.7 (CH), 132.8 (CH), 133.7 (C), 134.6 (C), 150.7 (C), 161.2 (C). HRMS (ESI) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 351.1668, found 351.1674.

#### Preparation of 4-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one **13** [17]

Acetonitrile (10 mL) and 500  $\mu\text{L}$  of a 70% perchloric acid solution (5.4 mmol, 6 equiv.) were added onto 300 mg of 2,4-dibromo-8-nitroquinoline (0.90 mmol, 1 equiv.) in a sealed tube. The reaction mixture was then heated at 100 °C in a microwave reactor during 1 h. The reaction mixture was poured into ice, neutralized with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. 4-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one **13** was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (87%, 0.78 mmol, 211 mg).

Compound **13** (C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): mp 239 °C (Lit: 240 °C),  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.20 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H3), 7.37–7.42 (m, 1H, H6), 8.36 (dd,  $J = 8.0$  and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.58 (dd,  $J = 8.3$  and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.42 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO)  $\delta$ : 121.0 (C), 122.6 (CH), 126.9 (CH), 129.4 (CH), 132.7 (C), 134.8 (C), 135.5 (CH), 136.5 (C), 159.5 (C).

#### Preparation of *N*-methylquinolin-2(1H)-one **16** [36]

DMF (30 mL) was added onto 1 g of quinoline-2(1H)-one (6.9 mmol, 1 equiv.), 1.43 g of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.3 mmol, 1.5 equiv.). The reaction mixture was heated at 80 °C and 430  $\mu\text{L}$  of methane iodide (6.9 mmol, 1 equiv.) were added dropwise. After 48 h, the reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed 5 times with water, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (7.5/2.5) as eluent. *N*-methylquinolin-2(1H)-one **16** was isolated and recrystallized in isopropanol to yield a white solid (71%, 4.90 mmol, 780 mg).

Compound **16** (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO): mp 76 °C (Lit: 74 °C),  $^1\text{H}$  NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.71 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H3), 7.21–7.25 (m, 1H, H6), 7.37 (dd,  $J = 8.1$  and 1.0 Hz, 1H, H5), 7.55–7.59 (m, 2H, H7 - H8), 7.67 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H4).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 29.4 (CH<sub>3</sub>), 114.1 (CH), 120.6 (C), 121.7 (CH), 122.1 (CH), 128.7 (CH), 130.6 (CH), 138.9 (CH), 140.0 (C), 162.3 (C).

#### Preparation of 2-methoxy-8-nitroquinoline **21** [16]

Under Argon atmosphere, 100 mg of 8-nitroquinolin-2(1H)-one (0.53 mmol, 1 equiv.) were solubilized in 5 mL of DMF and were added onto a DMF solution (5 mL) of 42 mg of 60% sodium hydride (1.05 mmol, 2 equiv.). After 10 min of stirring at rt, 65  $\mu\text{L}$  of methyl iodide (1.05 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. After one night stirring at rt, the reaction mixture was poured into ice. The resulting precipitate was filtered and dried *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether as eluent. 2-methoxy-8-nitroquinoline **21** was isolated and recrystallized in cyclohexane to yield a pale white solid (64%, 0.34 mmol, 70 mg).

Compound **21** (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): mp 125 °C (Lit: 114 °C),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 4.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.05 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H3), 7.42–7.46 (m, 1H, H6), 7.93 (dd,  $J = 8.1$  and 1.4 Hz, 1H, H5), 7.99 (dd,  $J = 7.6$  and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.07 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H4).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 54.1 (CH<sub>3</sub>), 115.1 (CH), 122.6 (CH), 124.0 (CH), 126.2 (C), 131.5 (CH), 138.2 (C), 138.5 (CH), 146.6 (C), 163.7 (C).

#### Preparation of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one **22**

Fifty milliliters of a 48% hydrobromic acid solution were added onto 1.34 g of 8-nitroquinolin-2(1H)-one (7.05 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 100 °C. Then 3.2 g of sodium bromate (21.1 mmol, 3 equiv.) were added with precaution (Br<sub>2</sub> formation). After 5 h under reflux, the reaction mixture was left for 2 h under the hood to evacuate remaining Br<sub>2</sub> vapors, and then poured into ice, neutralized with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*.

The crude residue was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (1/1) as an eluent. 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one **22** was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (68%, 4.8 mmol, 1.3 g).

Compound **22** (C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): mp 216 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.36–7.40 (m, 1H, H6), 7.89 (dd,  $J = 8.4$  and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.6 (s, 1H, H4), 8.56 (dd,  $J = 7.7$  and 1.6 Hz, 1H, H7), 11.51 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 119.9 (C), 122.1 (CH), 122.3 (C), 128.0 (CH), 132.9 (C), 133.2 (C), 134.8 (CH), 141.0 (CH), 157.5 (C). HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calcd for C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 268.9562, found 268.9554.

#### Preparation of 3-chloro-8-nitroquinolin-2(1H)-one **23**

Fifty milliliters of a 37% hydrochloric acid solution were added onto 1 g of 8-nitroquinolin-2(1H)-one (5.3 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was then stirred at 100 °C before 1.7 g of sodium chlorate (15.8 mmol, 3 equiv.) were added with precaution (Cl<sub>2</sub> formation). After 45 min under reflux, the reaction mixture was left for 2 h under the hood to evacuate remaining Cl<sub>2</sub> vapors, and then was poured into ice, neutralized with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using diethyl ether as an eluent. 3-chloro-8-nitroquinolin-2(1H)-one **23** was isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (62%, 3.3 mmol, 738 mg).

Compound **23** (C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): mp 195 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.37–7.41 (m, 1H, H6), 7.88 (dd,  $J$  = 7.7 and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.04 (s, 1H, H4), 8.55 (dd,  $J$  = 8.4 and 1.4 Hz, 1H, H7), 11.56 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 121.8 (C), 122.2 (CH), 127.9 (CH), 129.2 (C), 132.3 (C), 133.1 (C), 134.9 (CH), 137.0 (CH), 157.5 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  225.0067, found 225.0070.

#### Preparation of 3-bromo-2-methoxy-8-nitroquinoline **24**

Under Argon atmosphere, 250 mg of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one (0.93 mmol, 1 equiv.) were solubilized in 5 mL of dry DMF and were added onto a DMF solution (5 mL) of 74 mg of 60% sodium hydride (1.86 mmol, 2 equiv.). After 10 min of stirring at rt, 115  $\mu\text{L}$  of methyl iodide (1.86 mmol, 2 equiv.) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight, before being poured into ice. The resulting precipitate was filtered and dried *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (9/1) as eluent. 3-bromo-2-methoxy-8-nitroquinoline **24** was isolated to yield a pale white solid (55%, 0.51 mmol, 146 mg).

Compound **24** ( $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_3$ ): mp 208 °C,  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.43–7.49 (m, 1H, H6), 7.86 (dd,  $J$  = 8.1 and 1.4 Hz, 1H, H5), 8.02 (dd,  $J$  = 7.7 and 1.4 Hz, 1H, H7), 8.35 (s, 1H, H4), 12.44 (CH), 127.1 (C), 130.6 (CH), 136.7 (C), 140.6 (CH), 146.2 (C), 159.2 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  282.9718, found 282.9722.

#### Preparation of 8-amino-3-bromoquinolin-2(1H)-one **25**

Ethanol (20 mL) was added onto 300 mg of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one (1.11 mmol, 1 equiv.) and 1.1 g of tin (II) chloride (5.55 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was refluxed for 3 h. The reaction mixture was then neutralized into an aqueous solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , filtered on celite, extracted three times with dichloromethane and once with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/methanol (95/5) as eluent. 8-amino-3-bromoquinolin-2(1H)-one **25** was isolated to yield a pale brown solid (53%, 0.59 mmol, 140 mg).

Compound **25** ( $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}$ ): Dec. 248 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 5.60 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.84 (dd,  $J$  = 7.5 and 1.5 Hz, 1H, H7), 6.90 (dd,  $J$  = 7.7 and 1.5 Hz, 1H, H5), 6.95–6.99 (m, 1H, H6), 8.40 (s, 1H, H4), 11.35 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 115.2 (CH), 115.5 (CH), 116.6 (C), 120.6 (C), 123.5 (CH), 125.6 (C), 135.4 (C), 143.2 (CH), 158.3 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  238.9820, found 238.9820.

General procedure for the preparation of 5-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **26**, 6-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **27** [37], 7-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **28**, 5-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **29**, 6-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **30** [38] and 7-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **31**.

In a first step, according to a previously reported procedure [21], 1.2 equiv. of 3,3'-diethoxyacryloyl chloride (prepared from ethyl 3,3'-diethoxypropionate by successive saponification and reaction with  $\text{SOCl}_2$ ) was reacted at rt with 1 equiv. of the appropriate nitroaniline derivative in dichloromethane, in the presence of 2 equiv. of pyridine. The reaction mixtures were then poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were washed with brine, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. In a second step, each crude residue was reacted with 98% sulfuric acid and stirred at rt for 3–4 h (monitored by TLC). The reaction mixtures were then poured into ice, neutralized with  $\text{K}_2\text{CO}_3$  and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were washed with water,

dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated *in vacuo*. The final crude residues were purified by chromatography on silica gel.

5-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **26** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a pale brown solid (46%, 2.39 mmol, 490 mg), mp 213 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 2.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.78 (dd,  $J$  = 10.0 and 2.2 Hz, 1H, H3), 7.15 (dd,  $J$  = 8.5 and 0.6 Hz, 1H, H6), 7.99 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, H4), 8.40 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H7), 11.5 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 19.8 ( $\text{CH}_3$ ), 120.1 (C), 123.1 (CH), 123.3 (CH), 127.8 (CH), 131.7 (C), 134.1 (C), 136.6 (CH), 145.4 (C), 161.3 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  205.0613, found 205.0608.

6-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **27** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent and isolated to yield a brown solid (6%, 0.34 mmol, 70 mg), mp 200 °C (Lit: 199–200),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.50 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.74 (dd,  $J$  = 9.7 and 2.0 Hz, 1H, H3), 7.69 (s, 1H, H5), 7.74 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, H4), 8.33 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, H7), 11.22 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.5 ( $\text{CH}_3$ ), 122.0 (C), 123.7 (CH), 128.4 (CH), 131.7 (C), 131.8 (C), 132.8 (C), 135.9 (CH), 139.7 (CH), 161.6 (C).

7-methyl-8-nitroquinolin-2(1H)-one **28** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (52%, 3.42 mmol, 700 mg), mp 233 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.69 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H6), 7.15 (dd,  $J$  = 8.0 and 0.6 Hz, 1H, H3), 7.64 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H4), 7.74 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H5), 10.12 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.2 ( $\text{CH}_3$ ), 119.7 (C), 122.7 (CH), 125.5 (CH), 132.2 (CH), 132.6 (C), 135.6 (C), 137.6 (C), 139.9 (CH), 161.7 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  205.0613, found 205.0615.

5-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **29** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a dark orange solid (21%, 0.61 mmol, 135 mg), mp 246 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.09 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.68 (dd,  $J$  = 10.0 and 2.1 Hz, 1H, H3), 6.73 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, H6), 8.17 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H, H4), 8.52 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 1H, H7), 11.45 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 56.8 ( $\text{OCH}_3$ ), 102.8 (CH), 110.7 (C), 121.8 (CH), 127.0 (C), 130.6 (CH), 134.6 (CH), 135.6 (C), 161.7 (C), 161.8 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  221.0562, found 221.0561.

6-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **30** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ) was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/ethyl acetate (90/10) as eluent and isolated to yield a pale brown solid (4%, 0.05 mmol, 12 mg), mp 210 °C (Lit: 210–211 °C),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.76 (dd,  $J$  = 9.7 and 1.8 Hz, 1H, H3), 7.42 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, H5), 7.73 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, H4), 8.07 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, H7), 11.15 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 56.3 ( $\text{OCH}_3$ ), 113.5 (CH), 113.9 (C), 120.7 (CH), 122.9 (C), 124.4 (CH), 128.3 (C), 139.4 (CH), 153.5 (C), 161.4 (C).

7-methoxy-8-nitroquinolin-2(1H)-one **31** ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ) was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (90/10) as eluent, isolated and recrystallized in acetonitrile to yield a yellow solid (45%, 0.79 mmol, 175 mg), mp 244 °C,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.04 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.57 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, H3), 6.93 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, H6), 7.68 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 2H, H4 H5), 9.9 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 57.2 ( $\text{OCH}_3$ ), 105.0 (C), 106.9 (CH), 114.3 (C), 120.6 (CH), 133.5 (CH), 133.7 (C), 139.9 (CH), 155.9 (C), 161.8 (C). HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  221.0562, found 221.0556.

#### Electrochemistry

Voltammetric measurements were carried out with a

potentiostat Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) controlled by GPES 4.09 software. Experiments were performed at room temperature in a homemade airtight three-electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire of approximately 1 cm [2] apparent surface. The working electrode was GC microdisk (1.0 mm of diameter – Biologic SAS). The supporting electrolyte ( $\text{nBu}_4\text{N}^+\text{PF}_6^-$ ) (Fluka, 99% puriss electrochemical grade) and the solvent DMSO (Sigma-Aldrich puriss p. a. dried <0.02% water) were used as received and simply degassed under argon. The solutions used during the electrochemical studies were typically  $10^{-3}$  M in compound and 0.1 M in supporting electrolyte. Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling Ar and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Under these experimental conditions employed in this work, the half-wave potential ( $E_{1/2}$ ) of the ferrocene  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  couple in DMSO was  $E_{1/2} = 0.45$  V vs SCE. Experimental peak potentials have been measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

### Computational studies

All the calculations were carried out with the GAUSSIAN 09 suite [39]. Geometry optimizations were performed with the M06-2x [40] density functional and the 6-311++G (2 d, 2p) basis set. Previous studies have indicated that extended basis sets, with diffuse s- and p-type functions and polarization functions were important for the description of the electronic affinity of nitrobenzene derivatives [22,23]. The effect of solvation were described with the self-consistent reaction field (SCRF) method using the integral equation formalism polarizable continuum Model (IEFPCM) with DMSO as solvent [41]. Vibrational frequency calculation were used to confirm the convergence to local minima and to calculate the unscaled zero-point-energy (ZPE) and the entropy corrections at 298 K. The standard variation of the Gibbs free energies were calculated as the energy difference between anion-radical and neutral forms after full geometry optimization according to the following equation:  $\text{R-NO}_2 + 1 \text{ e}^- \rightarrow \text{R-NO}_2^-$ . Reduction potentials of the nitro-compounds were calculated using the equation based on Faraday's law:

$$E^\circ = -\frac{\Delta G_{\text{red}}}{nF} + E_H^0 \quad (1)$$

where  $\Delta G_{\text{red}}$  is the Gibbs free energy of reduction,  $n$  is the number of electrons transferred (i.e. one electron),  $F$  is the Faraday constant which equals  $23.06 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$  and  $E_H^0$  is the absolute potential of the normal hydrogen electrode. The  $E_H^0$  value was taken as  $-4.28 \text{ V}$  [42].

### Biology

#### Antileishmanial activity on *L. infantum* axenic amastigotes. [43]

*L. infantum* promastigotes (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Leishmania, Montpellier, France, expressing luciferase activity) in logarithmic phase cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 5% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin), were centrifuged at 900 g for 10 min. The supernatant was removed carefully and was replaced by the same volume of RPMI 1640 complete medium at pH 5.4 and incubated for 24 h at 24 °C. The acidified promastigotes were incubated for 24 h at 37 °C in a ventilated flask. Promastigotes were then transformed into axenic amastigotes. The

effects of the tested compounds on the growth of *L. infantum* axenic amastigotes were assessed as follows. *L. infantum* amastigotes were incubated at a density of  $2.10^6$  parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls DMSO, amphotericin B, miltefosine and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After a 48 h incubation period at 37 °C, each plate-well was then microscope-examined for detecting any precipitate formation. To estimate the luciferase activity of axenic amastigotes, 80  $\mu\text{L}$  of each well are transferred to white 96-well plates, Steady Glow<sup>®</sup> reagent (Promega) was added according to manufacturer's instructions, and plates were incubated for 2 min. The luminescence was measured in Microbeta Luminescence Counter (PerkinElmer). Inhibitory concentration 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes compared to control.  $\text{IC}_{50}$  values were calculated by non-linear regression analysis processed on dose response curves, using TableCurve 2D V5 software.  $\text{IC}_{50}$  values represent the mean of three independent experiments.

#### Antileishmanial activity on *L. donovani* promastigotes

The effects of the tested compounds on the growth of *L. donovani* promastigotes (MHOM/IN/00/DEVI) were assessed by MTT assay [44]. Briefly, promastigotes in logarithmic phase in Schneider's medium supplemented with 20% foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin), were incubated at an average density of  $10^6$  parasites/mL in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v), in duplicate. Appropriate controls treated by DMSO, miltefosine or amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After a 72 h incubation period at 27 °C, parasite metabolic activity was determined. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation. 10  $\mu\text{L}$  of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (10 mg/mL in PBS) were added to each well followed by incubation for another 4 h. The enzyme reaction was then stopped by addition of 100  $\mu\text{L}$  of 50% isopropanol–10% sodium dodecyl sulfate. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was finally measured at 570 nm in a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. Inhibitory concentration 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. donovani* and promastigotes compared to the control.  $\text{IC}_{50}$  were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software.  $\text{IC}_{50}$  values represent the mean value calculated from three independent experiments.

#### Antileishmanial activity on *L. donovani* intracellular amastigotes

The effects of the tested compounds on the growth of *Leishmania donovani* intracellular amastigotes (MHOM/IN/00/DEVI) were assessed according to the method of Da Luz et al. [45] 400  $\mu\text{L}$  of THP-1 cells activated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (final concentration: 50 ng/mL) were seeded in sterile chamber-slides at an average density of  $10^5$  cells/mL and incubated for 48 h at 37 °C and 6%  $\text{CO}_2$ . *L. donovani* promastigotes were centrifuged at 900 g for 10 min and the supernatant replaced by the same volume of Schneider 20% FCS pH 5.4 and incubated for 24 h at 27 °C. THP-1 cells were then infected by acidified promastigotes at an average density of  $10^6$  cells/mL (10:1 ratio) and chamber-slides incubated for 24 h at 37 °C. Then, in duplicate, the medium containing various



concentrations of tested-compounds was added (final DMSO concentration being inferior to 0.5% v/v). Appropriate controls treated with or without solvent (DMSO), and various concentrations of miltefosine and amphotericin B (reference drugs purchased from Sigma Aldrich) were added to each set of experiments. After 120 h incubation at 37 °C and 6% CO<sub>2</sub>, well supernatant was removed. Cells were fixed with analytical grade methanol and stained with 10% Giemsa. The percentage of infected macrophages in each assay was determined microscopically by counting at least 200 cells in each sample. IC<sub>50</sub> was defined as the concentration of drug necessary to produce a 50% decrease of infected macrophages compared to the control. IC<sub>50</sub> were calculated by non-linear regression analysis processed on dose–response curves, using TableCurve 2D V5.0 software. IC<sub>50</sub> values represent the mean value calculated from three independent experiments.

#### Antileishmanial activity on *L. donovani* promastigotes NTR1 and NTR2 over-expressing strain

Cell lines and culture conditions: The clonal *Leishmania donovani* cell line LdBOB (derived from MHOM/SD/62/1 S-CL2D) was grown as promastigotes at 26 °C in modified M199 media, as previously described [46]. LdBOB promastigotes overexpressing NTR1 (LinJ.05.0660) [47] and NTR2 (LinJ.12.0730) [48] were grown in the presence of nourseothricin (100 µg ml<sup>-1</sup>). *In vitro* drug sensitivity assays: To examine the effects of test compounds on growth, triplicate promastigote cultures were seeded with 5 × 10<sup>4</sup> parasites ml<sup>-1</sup>. Parasites were grown in 10 mL cultures in the presence of drug for 72 h, after which 200 µL aliquots of each culture were added to 96-well plates, 50 µM resazurin was added to each well and fluorescence (excitation of 528 nm and emission of 590 nm) measured after a further 4 h incubation [49]. Data were processed using GRAFIT (version 5.0.4; Erithacus software) and fitted to a 2-parameter equation, where the data are corrected for background fluorescence, to obtain the effective concentration inhibiting growth by 50% (EC<sub>50</sub>):  $y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^m}$ . In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor. Experiments were repeated at least two times and the data is presented as the mean plus standard deviation.

#### Antitrypanosomal activity on *T. brucei brucei* trypomastigotes

Assays were performed on *Trypanosoma brucei brucei* AnTat 1.9 strain (IMTA, Antwerpen, Belgium). It was cultured in MEM with Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al. [50] with the following modifications, 0.5 mM mercaptoethanol (Sigma Aldrich®, France), 1.5 mM L-cysteine (Sigma Aldrich®), 0.05 mM bathocuproine sulfate (Sigma Aldrich®) and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco®, France), at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The parasites were incubated at an average density of 2000 parasites/well in sterile 96-wells plates (Mc2®, France) with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (Sigma Aldrich®), in duplicate. Reference drugs suramin, pentamidine, eflornithine, and fexinidazole (purchased from Sigma Aldrich, France and Fluorochem, UK) suspended in NaCl 0.9% or DMSO, were added to each set of experiments. The effects of the tested compounds were assessed by the viability marker Alamar Blue® (Fisher, France) assay described by Răz et al. [51] After a 69 h incubation period at 37 °C, 10 µL of Alamar Blue® was then added to each well, and the plates were incubated for 5 h [52]. The plates were read in a PerkinElmer ENSPIRE (Germany) microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. IC<sub>50</sub> were calculated by nonlinear regression analysis processed on dose–response curves, using GraphPad Prism software (USA). IC<sub>50</sub> was defined as the concentration of drug

necessary to inhibit by 50% the viability of *T. brucei brucei* compared to the control. IC<sub>50</sub> values were calculated from three independent experiments in duplicate.

#### Antitrypanosomal activity on *T. b. brucei* trypomastigotes NTR1 over-expressing strain

*Trypanosoma brucei* bloodstream-form 'single marker' S427 (T7RPOL TETR NEO) and drug-resistant cell lines were cultured at 37 °C in HMI9-T medium [53] supplemented with 2.5 µg.mL<sup>-1</sup> G418 to maintain expression of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor protein. Bloodstream trypanosomes overexpressing the *T. brucei* nitroreductase (NTR1) [54] were grown in medium supplemented with 2.5 µg.mL<sup>-1</sup> phleomycin and expression of NTR was induced by the addition of 1 µg.mL<sup>-1</sup> tetracycline. Cultures were initiated with 1 × 10<sup>5</sup> cells. mL<sup>-1</sup> and sub-cultured when cell densities approached 1–2 (× 10<sup>6</sup>). mL<sup>-1</sup>.

In order to examine the effects of inhibitors on the growth of these parasites, triplicate cultures containing the inhibitor were seeded at 1 × 10<sup>5</sup> trypanosomes. mL<sup>-1</sup>. Cells overexpressing NTR were induced with tetracycline 48 h prior to EC<sub>50</sub> analysis. Cell densities were determined after culture for 72 h, as previously described [55]. EC<sub>50</sub> values were determined using the following two-parameter equation by non-linear regression using GraFit:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{[I]}{EC_{50}}\right)^m}$$

where the experimental data were corrected for background cell density and expressed as a percentage of the uninhibited control cell density. In this equation [I] represents inhibitor concentration and m is the slope factor.

#### Cytotoxic evaluation on HepG2 cell line

The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the HepG2 (hepatocarcinoma cell line from ECACC purchased from Sigma-Aldrich, ref 85011430-1 VL certified without mycoplasma) was done according to the method of Mosman with slight modifications [44]. Briefly, cells (5 × 10<sup>4</sup> cells/mL) in 100 µL of complete medium, [Alpha MEM Eagle from PAN BIOTECH supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After a 24 h incubation, 100 µL of medium with various product concentrations and appropriate controls were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100 µL of MTT solution (0.5 mg/mL in Alpha MEM Eagle) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 µL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer (Eon BioTek). DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. CC<sub>50</sub> were calculated by non-linear regression analysis processed on dose response curves, using TableCurve 2D V5 software. CC<sub>50</sub> values represent the mean value calculated from three independent experiments.

#### Cytotoxic evaluation on THP1 cell line

The evaluation of the tested molecules cytotoxicity on the

differentiated THP-1 cell line (acute monocytic leukemia cell line purchased from ATCC, ref TIB-202) was performed according to the method of Mosman with slight modifications [44]. Briefly, cells in 100  $\mu$ L of complete RPMI medium with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (final concentration: 50 ng/mL) were incubated at an average density of  $10^6$  cells/mL and in sterile 96-well plates. After 48 h incubation, 100  $\mu$ L of medium with various product concentrations dissolved in DMSO (final concentration less than 0.5% v/v) were added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C. Each plate-well was then microscope-examined for detecting possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. 100  $\mu$ L of MTT solution (0.5 mg/mL in medium without FCS) were then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100  $\mu$ L) was added to dissolve the resulting blue formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 10 min. The absorbance was measured at 570 nm with 630 nm as reference wavelength spectrophotometer using a BIO-TEK ELx808 Absorbance Microplate Reader. DMSO was used as blank and doxorubicin (purchased from Sigma Aldrich) as positive control. Cell viability was calculated as percentage of control (cells incubated without compound). The 50% cytotoxic concentration was determined from the dose–response curve by using the TableCurve 2D V5.0 software.

#### Ames test method

Mutagenicity test was carried out by using a modified version [56] of the liquid incubation assay of the classical Ames test. *S. typhimurium* tester strains (TA97a, TA98, TA100 and TA102) were grown overnight in a Nutrient Broth n°2 (Oxoid, France). After this period, 5–50 mM DMSO solutions of the tested drugs were added to 0.1 mL of culture and incubated with 4% S9 mix for 1 h at 37 °C with shaking. Each sample was assayed in duplicate. After incubation, 2 mL of molten top agar were mixed gently with the pre-incubated solution and poured onto Vogel-Bonner minimal agar plates. After 48 h at 37 °C in the dark, the number of spontaneous and drug induced revertants per plate was determined for each dose with a laser bacterial colony counter. A product was considered mutagenic when it induces a two-fold increase of the number of revertants, compared with the spontaneous frequency (negative control). Benzo [a]pyrene was used as a positive control with all *Salmonella* strains in presence of S9 mix.

#### Comet assay

The alkaline comet assay was used to detect DNA strand breaks and alkali-labile sites. Trypsinized HepG2 cells were embedded in 0.7% low-melting point agarose (Sigma “Low Gelling Temperature”) and laid on pre-cut sheets of polyester film (Gelbond® film) to perform minigel deposits as previously described [57]. Film were then placed in lysis solution (NaCl 2.5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 M, Tris 10 mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO pH 10) for 18 h at 4 °C. Electrophoresis (with a solution which contained 0.3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH > 13) was processed for 24 min in a tank with a power supply giving 28 V (resulting in 0.8 V/cm). After electrophoresis, films were immersed 2  $\times$  5 min in PBS for neutralization, followed by fixation in 100% ethanol for 1.5 h and drying. After staining with SYBR® Gold (Life Technologies) at 10 000 X dilution for 20 min, films were observed at 20 $\times$  magnification with an epifluorescence microscope equipped with an automated platform (Nikon NiE) and coupled to a camera (DS-Q1Mc) and the software Nikon NiS Element Advanced Research to automatically capture images. In these images, for each cell, the level of DNA damage was evaluated using a semi-automated scoring system, by measurement of the intensity of all tail pixels divided by the total intensity of all pixels

in head and tail of comet, by means of the software “Lucia comet assay” (Laboratory Imaging, Prague Czech Republic). Fifty cells per deposit and four deposits per sample were analysed. The median from these 200 values was calculated, and named “% tail DNA”.

#### Microsomal stability and plasma protein binding assays

##### Microsomal stability assay

The tested product and propranolol, used as reference, are incubated in duplicate (reaction volume of 0.5 mL) with female mouse microsomes (CD-1, 20 mg/mL, BD Gentest™) at 37 °C in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, in the presence of MgCl<sub>2</sub> (5 mM), NADP (1 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.4 U/mL) and glucose-6-phosphate (5 mM). For the estimation of the intrinsic clearance: 50  $\mu$ L aliquot at 0, 5, 10, 20, 30 and 40 min are collected and the reaction is stopped with 4 vol of acetonitrile (ACN) containing the internal standard. After centrifugation at 10000g, 10 min, 4 °C, the supernatants are kept at 4 °C for immediate analysis or placed at –80 °C in case of postponement of the analysis. Controls ( $t_0$  and  $t_{final}$ ) in triplicate are prepared by incubation of the internal standard with microsomes denatured by acetonitrile. The LC-MS used for this study is a Waters® Acuity I-Class/Xevo TQD, equipped with a Waters® Acuity BEH C18 column, 50  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m. The mobile phases are (A) ammonium acetate 10 mM and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid. The injection volume is 1  $\mu$ L and the flow rate is 600  $\mu$ L/min. The chromatographic analysis, total duration of 4 min, is made with the following gradient: 0 <  $t$  < 0.2 min, 2% (B); 0.2 <  $t$  < 2 min, linear increase to 98% (B); 2 <  $t$  < 2.5 min, 98% (B); 2.5 <  $t$  < 2.6 min, linear decrease to 2% (B); 2.6 <  $t$  < 4 min, 2% (B). 8-Bromo-6-chloro-3-nitro-2- (phenylsulfonylmethyl) imidazo [1,2-*a*]pyridine is used as internal standard. The quantification of each compound is obtained by converting the average of the ratios of the analyte/internal standard surfaces to the percentage of consumed product. The ratio of the control at  $t_0$  corresponds to 0% of product consumed. The calculation of the half-life ( $t_{1/2}$ ) of each compound in the presence of microsomes is done according to the equation:  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$ . Where  $k$  is the first-order degradation constant (the slope of the logarithm of compound concentration versus incubation time). The intrinsic clearance *in vitro* ( $Cl_{int}$  expressed in  $\mu$ L/min/mg) is calculated according to the equation:  $Cl_{int} = \frac{\text{dose}}{AUC_{\infty}} \times [\text{microsomes}]$ . Where dose is the initial concentration of product in the sample,  $AUC_{\infty}$  is the area under the concentration-time curve extrapolated to infinity and [microsomes] is the microsome concentration expressed in mg/ $\mu$ L.

##### Plasma protein binding procedure

The plasma doped with the tested compound is incubated at 37 °C in triplicate in one of the compartments of the insert, the other compartment containing a phosphate buffer solution at pH 7.2. After stirring for 4 h at 300 rpm, a 25  $\mu$ L aliquot of each compartment is taken and diluted; the dilution solution is adapted to obtain an identical matrix for all the compartments after dilution. In parallel, the reprocessing of a plasma doped but not incubated will allow to evaluate the recovery of the study. The LC-MS used for this study is a Waters® Acuity I-Class/Xevo TQD, equipped with a Waters® Acuity BEH C18 column, 50  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m. The mobile phases are (A) ammonium acetate 10 mM and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid. The injection volume is 1  $\mu$ L and the flow rate is 600  $\mu$ L/min. The chromatographic analysis, total duration of 4 min, is made with the following gradient: 0 <  $t$  < 0.2 min, 2% (B); 0.2 <  $t$  < 2 min, linear increase to 98% (B); 2 <  $t$  < 2.5 min, 98% (B); 2.5 <  $t$  < 2.6 min, linear decrease to 2% (B); 2.6 <  $t$  < 4 min, 2% (B). Carbamazepine, oxazepam, warfarine and diclofenac are used as reference drugs and Propranolol is used as internal standard. The unbound fraction ( $f_u$ ) is calculated according to the following

formula:  $f_u = \frac{A_{\text{plasma, 4h}} - A_{\text{PBS, 4h}}}{A_{\text{plasma, 4h}}} \times 100$ . The percentage of recovery is calculated according to the following formula: % Recovery =  $\frac{(V_{\text{PBS}} \times A_{\text{PBS, 4h}}) + (V_{\text{plasma}} \times A_{\text{plasma, 4h}})}{(V_{\text{plasma}} \times A_{\text{plasma, 0h}})}$ . Where A is the ratio of the area under peak of the studied molecule and the area under peak of the internal standard (propranolol 200 nM). V is the volume of solution present in the compartments (VPBS = 350  $\mu$ L and Vplasma = 200  $\mu$ L).

## References

- [1] D. Pace, Leishmaniasis, J. Infect. 69 (2014) S10–S18, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>.
- [2] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human African trypanosomiasis, Lancet 390 (2017) 2397–2405, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6).
- [3] [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/).
- [4] World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>, updated 04/2017.
- [5] World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>, updated 01/2017.
- [6] B. Zulfiqar, T.B. Shelper, V.M. Avery, Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development, Drug Discov. Today 22 (2017) 1516–1531, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>.
- [7] A. Ponte-Sucre, A. Gamarro, J.C. Dujardin, M.P. Barrett, R. Lopez-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenchanya, B. Papadopolou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge, PLoS Neglected Trop. Dis. 11 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052> e0006052.
- [8] M.C. Field, D. Horn, A.H. Fairlamb, M.A.J. Ferguson, D.W. Gray, K.D. Read, M. De Rycker, L.S. Torrie, P.G. Wyatt, S. Wyllie, I.H. Gilbert, Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need, Nat. Rev. Microbiol. 15 (2017) 217–231, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193>.
- [9] S. Patterson, S. Wyllie, S. Norval, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, J.L. Auder, M. Osuna-Cabello, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis, eLife 5 (2016) e09744, <https://doi.org/10.7554/eLife.09744>.
- [10] W.C. Ang, A.M. Jarrad, M.A. Cooper, M.A.T. Blaskovich, Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases, J. Med. Chem. 60 (2017) 7636–7657, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00143>.
- [11] DNDi: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/updated/12/2017>.
- [12] V.K.B.K. Mesu, W.M. Kalonji, C. Bardonneau, O.V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, V. Kuziena, J.F. Lubaki, S.L. Vuvu, P.N. Ngima, H.M. Mbembo, M. Ilunga, A.K. Bonama, J.A. Heradi, J.L.L. Solomo, G. Mandula, L.K. Badibabi, F.R. Dama, P.K. Lukula, D.N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial, Lancet (2018) 144–154, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32758-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7).
- [13] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, Trends Parasitol. 30 (2014) 289–298, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
- [14] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis, Sci. Transl. Med. 4 (2012) 119re1, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326>.
- [15] P. Verhaeghe, P. Rathelot, S. Rault, P. Vanelle, Convenient preparation of original vinylic chlorides with antiparasitic potential in quinoline series, Lett. Org. Chem. 3 (2006) 891–897, <https://doi.org/10.1016/S157017806779467997>.
- [16] L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Castera-Ducros, A. Dumètre, L. Mbachi, S. Hutter, M. Kraiem-M'Rabet, M. Laget, V. Remusat, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series, Eur. J. Med. Chem. 54 (2012) 75–86, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.029>.
- [17] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, V. Remusat, M. Kraiem-M'Rabet, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Looking for new antileishmanial derivatives in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series, Eur. J. Med. Chem. 92 (2015) 282–294, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.029>.
- [18] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, L. Paloque, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, S. Rault, A. Valentin, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 2377–2386, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.064>.
- [19] V.P. Andreev, Y.P. Nizhnik, Reaction of 2,4-dibromoquinoline with hydrogen chloride, Russ. J. Org. Chem. 38 (2002) 137–138, <https://doi.org/10.1023/A:1015331531268>.
- [20] N.J. O'Brien, M. Brzozowski, D.J.D. Wilson, L.W. Deady, B.M. Abbott, Synthesis and biological evaluation of substituted 3-anilinoquinolin-2(1H)-ones as PDK1 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 3781–3790, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.037>.
- [21] F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke, K. Rimvall, 2-(4-Alkylpiperazin-1-yl) quinolines as a new class of Imidazole-free Histamine H<sub>3</sub> Receptor Antagonists, J. Med. Chem. 48 (2005) 306–311, <https://doi.org/10.1021/jm031028z>.
- [22] R.I. Zubatyuk, L. Gorb, O.V. Shishkin, M. Qasim, J. Leszczynski, Exploration of density functional methods for one-electron reduction potential of nitrobenzenes, J. Comput. Chem. 31 (2010) 144–150, <https://doi.org/10.1002/jcc.21301>.
- [23] M. Uchimiya, L. Gorb, O. Isayev, M.M. Qasim, J. Leszczynski, One-electron standard reduction potentials of nitroaromatic and cyclic nitramine explosives, Environ. Pollut. 158 (2010) 3048–3053, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.033>.
- [24] E. Torreele, B. Bourdin Trunz, D. Tweats, M. Kaiser, R. Brun, G. Mazué, M.A. Bray, B. Pécou, Fexinidazole – a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness, PLoS Neglected Trop. Dis. 4 (2010) e923, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>.
- [25] S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation, Antimicrob. Agents Chemother. 57 (2013) 901–906, <https://doi.org/10.1128/AAC.01788-12>.
- [26] S. Wyllie, A.J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B.J. Foth, M. Berriman, K.D. Read, A.H. Fairlamb, Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in Leishmania, PLoS Pathog. 12 (2016) e1005971, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005971>.
- [27] V. Purohit, A.K. Basu, Mutagenicity of nitroaromatic compounds, Chem. Res. Toxicol. 13 (2000) 673–692, <https://doi.org/10.1021/tx000002x>.
- [28] E.J. Rosenkranz, E.C. McCoy, R. Mermelstein, H.S. Rosenkranz, Evidence for the existence of distinct nitroreductases in Salmonella typhimurium: roles in mutagenesis, Carcinogenesis 3 (1982) 121–123, <https://doi.org/10.1093/carcin/3.1.121>.
- [29] A. Buschini, L. Ferrarini, S. Franzoni, S. Galati, M. Lazzaretti, F. Mussi, C. Northfleet de Albuquerque, T.-M. Araujo Domingues Zucchi, P. Poli, Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole and metronidazole, J. Parasitol. Res. 2009 (2009), <https://doi.org/10.1155/2009/463575>.
- [30] F. Misani, N.T. Bogert, The search for superior drugs for tropical diseases; further experiments in the quinolone group, J. Org. Chem. 10 (1945) 458–463, <https://doi.org/10.1021/jo01181a012>.
- [31] I.G. Moores, R.K. Smalley, H. Suschitzky, Alkaline Hydrolysis of 2-(Tri-fluoromethyl)imidazo[4,5-f] and -[4,5-h] quinolines, J. Fluorine Chem. 20 (1982) 573–580, [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(00\)82282-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(00)82282-4).
- [32] M. Ishikawa, I. Kikkawa, Studies on quinoline derivatives. IV, Yakugaku Zasshi 75 (1955) 36–39, [https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.1\\_36](https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.1_36).
- [33] V.V. Patil, G.S. Shankarling, Steric-hindrance-induced Regio- and Chemo-selective Oxidation of Aromatic amines, J. Org. Chem. 80 (2015) 7876–7883, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00582>.
- [34] O.H. Johnson, C.S. Hamilton, Syntheses in the quinoline series. III. The nitration of 2-chloro-4-methylquinoline and the preparation of some 2-hydroxy-4-methyl-8-(dialkylaminoalkyl)-aminoquinolines, J. Am. Chem. Soc. 63 (1941) 2867–2869, <https://doi.org/10.1021/ja01856a003>.
- [35] A.R. Todorov, T. Wirtanen, J. Helaja, Photoreductive removal of O-Benzyl groups from Oxyarene N-Heterocycles assisted by O-Pyridine-pyridone Tautomerism, J. Org. Chem. 82 (2017) 13756–13767, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02775>.
- [36] E. Rosenhauer, Über Reaktionen von N-Alkyl- $\alpha$ -methylen-chinolanen, I.: Diazo-Kupplung der Methylenbase in neutraler Lösung. (Mitbearbeitet von O. Dannhofer.), Eur. J. Inorg. Chem. 57 (1924) 1291–1294, <https://doi.org/10.1002/cber.19240570813>.
- [37] T. Hashimoto, Amyostatic poisons. VIII. Syntheses of alkyl derivatives of 3-amino-3,4-dihydrocarbostyryl and diamino-3,4-dihydrocarbostyryl, Yakugaku Zasshi 75 (1955) 340–342, [https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.3\\_340](https://doi.org/10.1248/yakushi1947.75.3_340).
- [38] K. Mislav, J.B. Koepfli, The synthesis of potential Antimalarials. Some 2-substituted 8-(3-Diethylaminopropylamino)-quinolines, J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 1553–1556, <https://doi.org/10.1021/ja01212a050>.
- [39] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr, J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. (2013) Gaussian 09, Revision D01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [40] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, Thero. Chem. Acc. 120 (2008) 215–241, <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>.
- [41] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, Chem. Rev. 105 (2005) 2999–3093, <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [42] C.P. Kelly, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Aqueous solvation free energies of Ions and Ion-water Clusters based on an accurate value for the absolute aqueous

- solvation free energy of the Proton, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16066–16081, <https://doi.org/10.1021/jp063552y>.
- [43] C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A.F. Alvarez, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, Synthesis, characterization, and antileishmanial activity of neutral *N*-heterocyclic carbenes gold(I) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 1635–1643, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.060>.
- [44] T.J. Mosman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [45] R.I. Da Luz, M. Vermeersch, J.C. Dujardin, P. Cos, L. Maes, Vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field Isolates: Preconditioning of promastigotes Enhances Infectivity for macrophage host cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 5197–5203, <https://doi.org/10.1128/AAC.00866-09>.
- [46] S. Goyard, H. Segawa, J. Gordon, M. Showalter, R. Duncan, S.J. Turco, S.M. Beverley, An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans, *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (2003) 31–42, [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00142-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00142-7).
- [47] S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 901–906, <https://doi.org/10.1128/AAC.01788-12>.
- [48] S. Wyllie, A.J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B.J. Foth, M. Berriman, K.D. Read, A.H. Fairlamb, Activation of bicyclic nitro-drugs by a novel nitroreductase (NTR2) in Leishmania, *PLoS Pathog.* 12 (2016) e1005971, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005971>.
- [49] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F.R.C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K.D. Read, A.H. Fairlamb, The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 119re1, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326>.
- [50] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *T. brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*, *EMBO J.* 4 (1985) 1273–1277.
- [51] B. Răz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, The AlamarBlue® Blue assay to determine drug sensitive of African trypanosome (*T. brucei rhodesiense* and *T. brucei gambiense*) in vitro, *Acta Trop.* 68 (1997) 139–147, [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00079-X).
- [52] J. Guillon, A. Cohen, R. Nath Das, C. Boudot, N. Gueddouda, S. Moreau, L. Ronga, S. Savrimoutou, S. Rubio, S. Amaziane, A. Dassonville-Klimpt, N. Asas, B. Courtioux, J.L. Mergny, C. Mullié, P. Sonnet, Design, synthesis, and anti-protozoal evaluation of new 2,9-bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline derivatives, *Chem. Biol. Drug Des.* (2018) 1–22, <https://doi.org/10.1111/cbdd.13164>.
- [53] N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A.H. Fairlamb, *FEBS J.* 276 (2009) 376–386.
- [54] S. Wyllie, B.J. Foth, A. Kelner, A.Y. Sokolova, M. Berriman, A.H. Fairlamb, *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (2016) 625–634.
- [55] D.C. Jones, I. Hallyburton, L. Stojanovski, K.D. Read, J.A. Frearson, A.H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1478–1486.
- [56] M. De Méo, M. Laget, C. Di Giorgio, H. Guiraud, A. Botta, M. Castegnaro, G. Duménil, Optimization of the Salmonella/mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs, *Mutat. Res.* 340 (1996) 51–65.
- [57] H. Perdry, K.B. Gutzkow, M. Chevalier, L. Huc, G. Brunborg, E. Boutet-Robinet, Validation of Gelbond® high-throughput alkaline and Fpg-modified comet assay using a linear mixed model, *Environ. Mol. Mutagen.* (2018), <https://doi.org/10.1002/em.22204>.

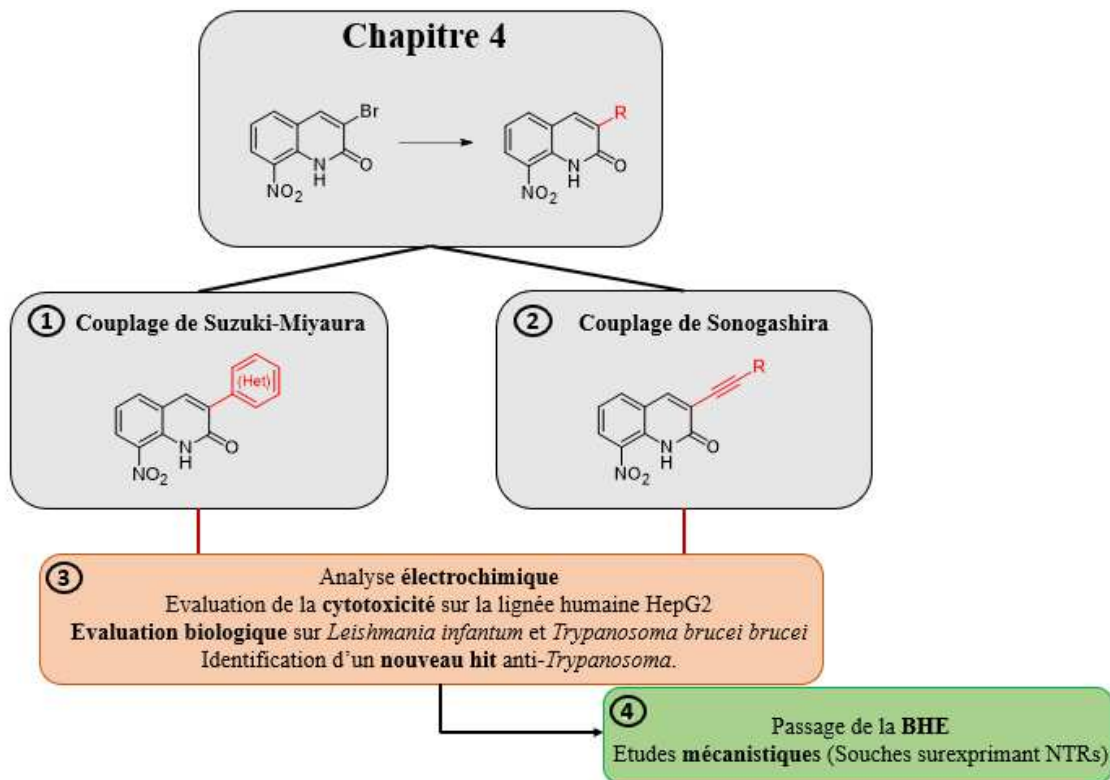


## CHAPITRE 4

# Pharmacomodulation anti-*Trypanosomatidae* en position 3 *via* des couplages pallado-catalysés.

## Chapitre 4 : Pharmacomodulation anti-*Trypanosomatidae* en position 3 *via* des couplages pallado-catalysés.

### 1. Introduction



**Figure 81** : Résumé des objectifs pharmacochimiques du chapitre 4.

L'étude du pharmacophore présentée dans le chapitre précédent a notamment permis d'identifier un nouveau hit actif à la fois sur *Leishmania* et *Trypanosoma*, la 3-bromo-8-nitroquinoléine-2(1H)-one **24**. Sur la base de ces résultats, des études de RSA en position 3 du noyau ont été réalisées *via* des couplages pallado-catalysés (Figure 81). En effet, si la 4-bromo-8-nitroquinoléine-2(1H)-one **15** possède une activité antileishmanienne moyenne ( $CI_{50} = 20,3 \mu M$ ), son isomère de position en 3 a montré une activité trois fois plus forte ( $CI_{50} = 7,1 \mu M$ ). Ainsi, malgré les activités moyennes des dérivés préparés *via* des couplages pallado-catalysés en position 4, il nous est apparu intéressant de synthétiser leurs isomères de position 3.

Dans une première partie, un travail de synthèse organique a été effectué menant à la préparation de 26 nouvelles molécules substituées en position 3 du pharmacophore. En effet, l'introduction d'un atome de brome en position 3 du noyau, un atome volumineux et augmentant la lipophilie du pharmacophore, semble favorable à de bonnes activités antikinétoplastidés. Ainsi, les couplages de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira permettent l'introduction sur la 3-bromo-8-nitroquinoléine-2(1H)-one (molécule **24**), de groupements (hétéro)aryles et phénylalcynyles, également considérés comme volumineux et plutôt lipophiles. Une première phase d'optimisation de ces deux réactions a été réalisée

puis dans une seconde phase, les meilleures conditions identifiées pour la réaction de Suzuki-Miyaura ont été appliquées à toute une gamme d'acides (hétéro)arylboroniques portant différents groupements (électrodonneur ou électroattracteur) en différentes positions (en *ortho*, en *meta* ou en *para* de l'aryle), afin d'explorer largement l'espace chimique. Une analyse électrochimique a également été effectuée sur ces nouvelles molécules afin d'étudier l'effet de la substitution de la position 3 du pharmacophore sur les potentiels de réduction.

Dans une seconde partie, l'évaluation biologique de toutes les nouvelles molécules synthétisées a été réalisée *via* des tests de cytotoxicité sur la lignée HepG2 et d'activité antiparasitaire sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*. Enfin, une étude mécanistique a été réalisée sur le meilleur dérivé de cette série tout comme l'évaluation de sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, un paramètre important dans le développement d'une molécule contre la THA, dont le stade 2 est méningo-encéphalique.

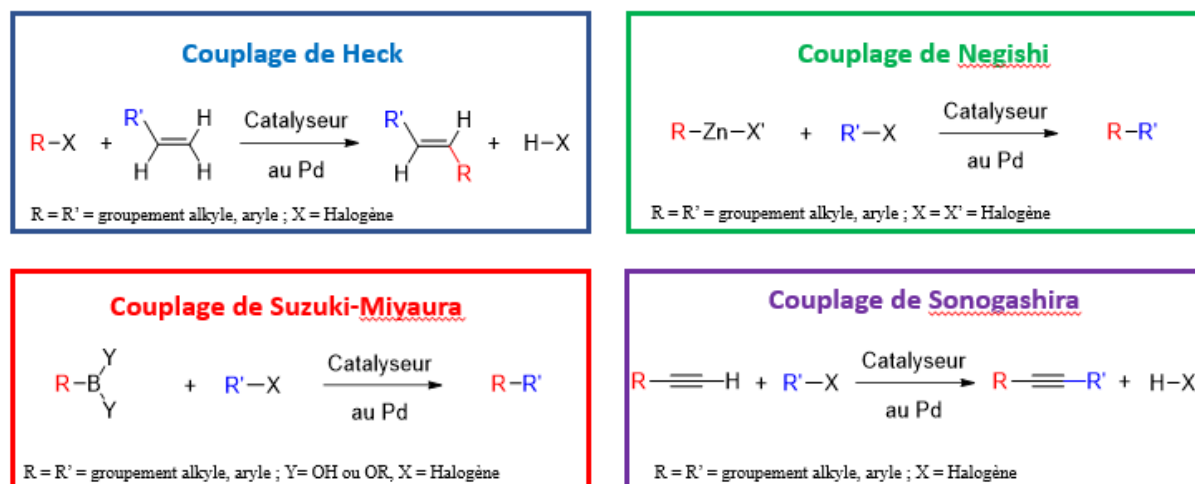
## 2. Les couplages pallado-catalysés en chimie organique.

Les réactions permettant la création d'une liaison carbone-carbone sont parmi les plus importantes en chimie organique car elles sont des étapes clés pour synthétiser les squelettes carbonés de molécules complexes pouvant aussi bien être utilisées pour leurs propriétés optiques, électroniques ou thérapeutiques. Le rôle majeur des réactions permettant la formation de liaisons carbone-carbone est reconnu internationalement. En effet, de nombreux prix Nobel ont été remis pour récompenser la découverte de ce type de réactions dont la réaction de Grignard en 1912, la réaction de Diels-Alder en 1950, la réaction de Wittig en 1979 ou plus récemment la métathèse d'oléfines en 2005. Lors de la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreux chercheurs se sont par ailleurs intéressés à la chimie des métaux de transition, ce qui a permis la synthèse de nombreux composés capables d'activer des molécules organiques et ainsi catalyser la formation de liaisons carbone-carbone. Parmi ces métaux de transition, le pouvoir catalytique du palladium a rapidement été découvert, *via* l'oxydation de l'éthylène en acétaldéhyde au cours d'une réaction, aujourd'hui appelée procédé Wacker.<sup>366</sup>

En 2010, un nouveau prix Nobel a été accordé à R. F. Heck, E. Negishi et A. Suzuki pour la découverte de trois couplages pallado-catalysés permettant la formation de liaisons carbone-carbone. Même si certains chercheurs n'ont pas été récompensés, il existe d'autres réactions tout aussi importantes comme le couplage de Sonogashira qui permet par exemple la formation d'une liaison  $Csp^2 - Csp$  (Figure 82).

<sup>366</sup> J. Reinhard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9034 – 9037



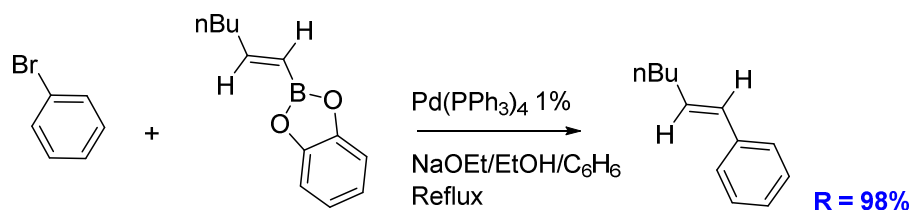


**Figure 82 :** Exemples de couplages pallado-catalysés à l'origine de la formation de nouvelles liaisons carbone-carbone.

Du fait des conditions modérées dans lesquelles ces réactions ont lieu et de leur tolérance à un grand nombre de groupements fonctionnels, les couplages pallado-catalysés se sont très vite répandus en chimie organique et notamment en chimie médicinale

## 2.1 Les réactions pallado-catalysées de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira.

La réaction de Suzuki-Miyaura a été découverte en 1979 par Akira Suzuki, professeur à l'Université d'Hokkaido, et son assistant Norio Miyaura.<sup>367</sup> Elle permet la formation d'une liaison  $Csp^2 - Csp^2$  via le couplage d'un acide ou d'un ester boronique avec un halogénure d'aryle en présence d'un complexe de Palladium (0) ou de Palladium (II) et d'une base (Figure 83). Cette réaction présente l'avantage d'utiliser des composés organoborés qui sont désormais nombreux et facilement accessibles commercialement, thermostables, et compatibles avec tout type de solvants. De plus, les conditions de réactions sont souvent assez douces et les sous-produits organiques formés sont facilement éliminés. De nombreux travaux d'optimisation de cette réaction ont été réalisés, permettant notamment d'étendre les substrats utilisés à des halogénures d'alcényles et d'alkyles.<sup>368</sup> Enfin une autre amélioration majeure a été le remplacement de composés organoborés par des acides et des esters boroniques, permettant d'augmenter les rendements et d'utiliser des bases plus faibles.



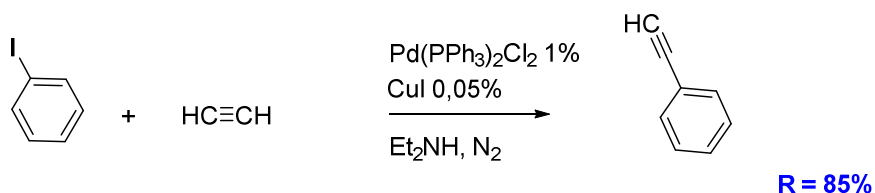
**Figure 83 :** Réaction de couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura mise au point en 1979.

<sup>367</sup> N. Miyaura, K. Yamada et A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 3437-3440.

<sup>368</sup> A. Suzuki, *Chem. Commun.*, **2005**, 4759-4763.

Ainsi, presque 40 ans après sa découverte, la réaction de Suzuki-Miyaura suscite toujours un intérêt particulier, tant au niveau de la méthodologie (nouveaux catalyseurs, nouveaux substrats) que des applications (synthèse organique, polymérisation, etc.).<sup>369</sup>

La réaction de Sonogashira a quant à elle été découverte en 1975 par Kenkichi Sonogashira, alors professeur de chimie à l'université d'Osaka<sup>370</sup> Cette réaction permet la création d'une liaison Csp – Csp<sup>2</sup> via le couplage d'un alcyne vrai avec un halogénure d'aryle, en présence d'un catalyseur de palladium (0) ou de palladium (II) et d'un co-catalyseur de cuivre (I) (Figure 84). Cette réaction est souvent réalisée dans des conditions douces à température ambiante et sous atmosphère inerte. Une quantité catalytique de palladium et un excès de base sont généralement utilisés, Sonogashira utilisant même la diéthylamine comme solvant en 1975.



**Figure 84 :** Réaction de couplage pallado-catalysée de Sonogashira, mise au point en 1975.

Tout comme la réaction de Suzuki-Miyaura, la grande utilité du couplage de Sonogashira en synthèse organique a mené à de nombreux travaux d'optimisation. Parmi ceux-ci, le remplacement des solvants organiques fréquemment utilisés comme le DMF ou le toluène par de l'eau,<sup>371</sup> ou encore la suppression du sel de cuivre afin d'éviter un homocouplage de l'alcyne, souvent constaté au cours de cette réaction.<sup>372</sup> En effet, la présence de cuivre couplée à celle d'oxygène dans le milieu réactionnel conduit à la formation de ce produit secondaire, un diyne symétrique, à travers une réaction appelée couplage de Glaser-Hay. Par ailleurs, une étude a identifié différents facteurs qui favorisent le bon déroulement de la réaction de Sonogashira incluant notamment la présence de groupements électroattracteurs sur les halogénures d'aryle ou sur les dérivés d'acétylène utilisés.<sup>373</sup>

<sup>369</sup> I. Maluenda et O. Navarro, *Molecules*, **2015**, 20, 7528-7557.

<sup>370</sup> K. Sonogashira, Y. Tohda et N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 4467 – 4470.

<sup>371</sup> C. A. Fleckenstein et H. Plenio, *Green Chem.* **2008**, 10, 563-570.

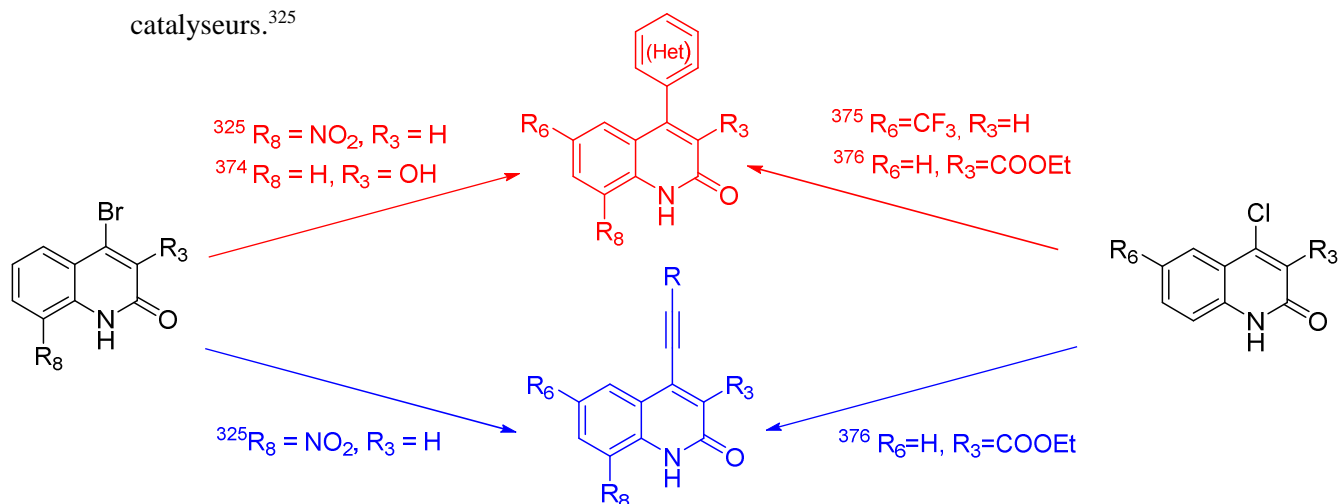
<sup>372</sup> B. Liang, M. Dai, J. Chen, *et al. J. Org. Chem.* **2005**, 70, 391-393.

<sup>373</sup> M. Schilz et H. Plenio, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 2798-2807.

## 2.2 Couplages pallado-catalysés en positions 3 et 4 de dérivés à noyau quinoléin-2(1H)-ones.

Dans la littérature, il existe quelques protocoles décrivant des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira sur la partie pyridone de quinoléin-2(1H)-ones :

- 1) En position 4, deux types de substrats sont utilisés pour réaliser ces deux types de réactions de couplages pallado-catalysés : des dérivés de 4-chloro et 4-bromoquinoléin-2(1H)-one (Figure 85). Pour la réaction de Suzuki-Miyaura, les conditions de couplages les plus fréquemment utilisées font intervenir du DMF<sup>325</sup> ou un mélange DME/H<sub>2</sub>O<sup>374</sup> comme solvant, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>375</sup> comme catalyseur et K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>376</sup> ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>374</sup> comme base. Pour la réaction de Sonogashira, uniquement deux protocoles sont décrits dans des publications scientifiques<sup>325,376</sup>, les conditions de réaction de ces deux protocoles étant très différentes pour chacun des paramètres réactionnels. Par ailleurs, un des protocoles décrits a été réalisé dans notre laboratoire sur un dérivé de 8-nitroquinoléin-2(1H)-one via des conditions faisant intervenir du DMF comme solvant, de la triéthylamine comme base, et du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ainsi que du CuI comme catalyseurs.<sup>325</sup>



**Figure 85 :** Réactions de couplage pallado-catalysés en position 4 de dérivés de quinoléin-2(1H)-ones décrites dans la littérature.

- 2) En position 3, deux types de substrats sont également utilisés afin d'effectuer un couplage de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira, à savoir des dérivés de 3-iodo et de 4-bromoquinoléin-2(1H)-one. Pour le couplage de Suzuki-Miyaura, 3 protocoles sont décrits dans des publications scientifiques (Figure 86). Les conditions réactionnelles comprennent un mélange entre un

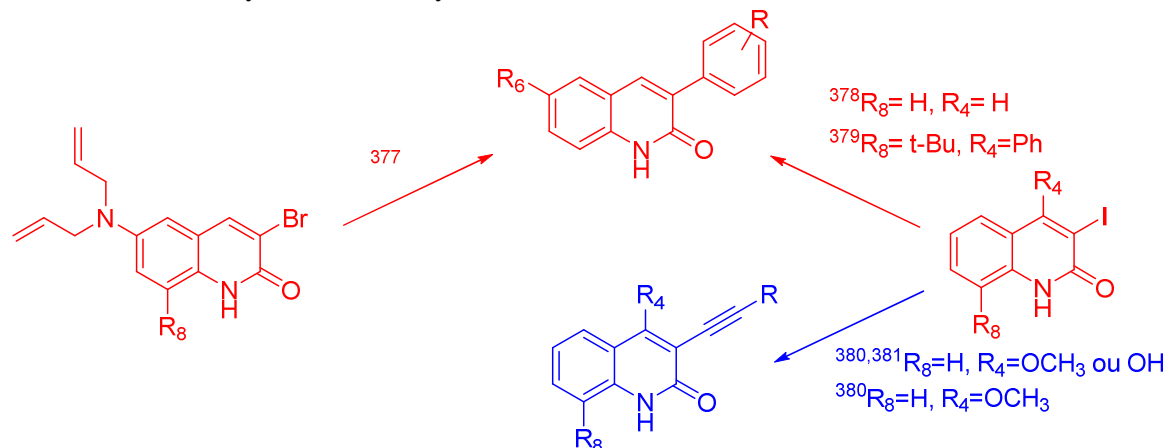
<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.

<sup>374</sup> R. Paterna, V. Andre et M. T. Duarte, *J. Org. Chem.*, **2013**, 28, 6280-6290

<sup>375</sup> T. Glasnov, N. Stadlbauer, C. O. Kappe *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3864-3870.

<sup>376</sup> L. Zhang, Y. Luo, S. Yu, *et al.*, *J. Heter. Chem.*, **2012**, 49, 1254-1256.

solvant organique et de l'eau (DMF/H<sub>2</sub>O<sup>377</sup> et THF/H<sub>2</sub>O<sup>378</sup>), un carbonate comme base (respectivement Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>378</sup>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>379</sup> et Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>379</sup>) et un catalyseur de palladium (II) (Pd(dppf)Cl<sub>2</sub><sup>378,379</sup> et Pd(PPh)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub><sup>380</sup>). Pour le couplage de Sonogashira, deux protocoles sont décrits dans des journaux scientifiques utilisant des dérivés de 3-iodoquinoléin-2(1*H*)-one. Les conditions de réactions font intervenir le Pd(PPh)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> comme catalyseur au palladium, le CuI comme co-catalyseur et la triéthylamine comme base et comme solvant.<sup>380,381</sup>



**Figure 86 :** Réactions de couplage pallado-catalysé en position 3 de dérivés de quinoléin-2(1*H*)-ones, décrites dans la littérature.

Par ailleurs, il existe un beaucoup plus grand nombre de protocoles publiés dans des journaux scientifiques qui décrivent des couplages pallado-catalysés en position 3, sur des dérivés *N*-alkylés de quinoléin-2(1*H*)-ones. Sur la base de ces données de la littérature, notre premier objectif de synthèse a été d'étudier les couplage de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira en utilisant la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one (molécule **24**) comme substrat.

### 3. Etude des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira sur la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

#### 3.1. Mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura.

Le mécanisme réactionnel de la réaction de Suzuki-Miyaura fait intervenir trois étapes successives : une addition oxydante, une transméallation et une élimination réductrice (Figure 87) :

<sup>377</sup> M. S. Tremblay, M. Halim et D. Sames, *JACS*, **2007**, 129, 7570-7577.

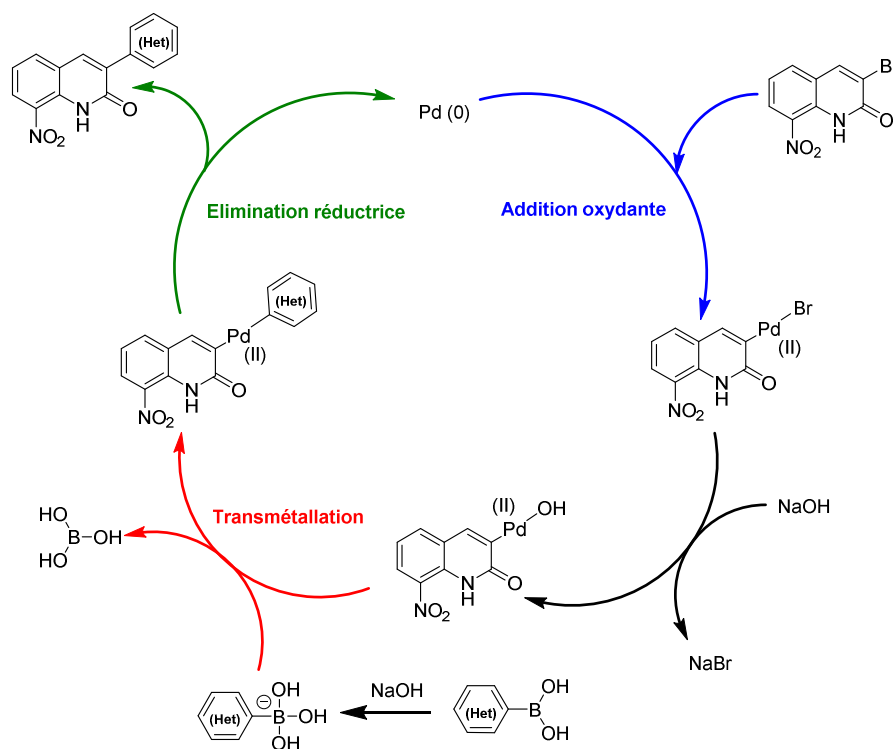
<sup>378</sup> Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 905-909.

<sup>379</sup> P. R. Likhar, S. S. Racharlawar, M. V. Karkhelikar, *et al.*, *Synthesis*, **2011**, 15, 2407-2414.

<sup>380</sup> J. Reisch et A. Bathe, *Liebigs Annalen Der Chemie*, **1988**, 1, 69-73.

<sup>381</sup> J. Reisch et P. Nordhaus, *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 167-171.

- La première étape est une addition oxydante du complexe de palladium (0) en palladium (II) au niveau de la liaison C (sp<sup>2</sup>) – halogène. Il a par ailleurs été montré qu'à la différence des substrats iodés, cette étape est limitante dans le cas des substrats bromés, ce qui pourrait être compensé par la présence à proximité de cet atome de brome d'un groupement électroattracteur qui favoriserait le couplage.<sup>382</sup>
- La seconde étape est une transmétallation Bore-Palladium du groupement (hétéro)aryle. Cependant, la différence d'électronégativité entre l'atome de bore et le carbone est faible, ce qui rend difficile la transmétallation. Dans l'acide boronique, le bore a une orbitale p vacante qui, en présence d'une base, va permettre la formation d'un boron-ate, plus nucléophile, qui favorisera la transmétallation.<sup>383</sup>
- La dernière étape est une élimination réductrice du palladium. Elle permet la formation du produit de couplage et la régénération du catalyseur de palladium (0) qui peut alors initier un nouveau cycle catalytique.



**Figure 87 :** Mécanisme réactionnel postulé du couplage de Suzuki-Miyaura entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one et l'acide phénylboronique en présence de soude.

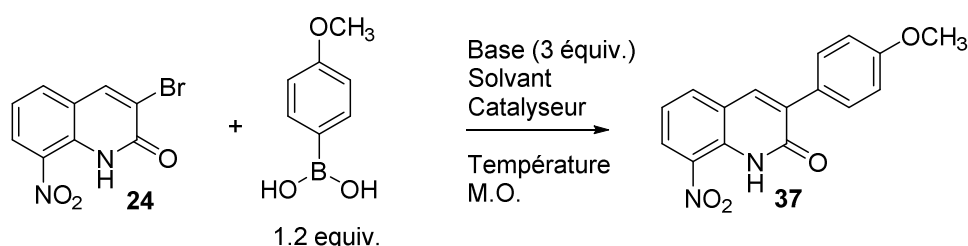
### 3.1.1. Mise au point du couplage de Suzuki-Miyaura.

Une optimisation du couplage de Suzuki-Miyaura a été effectuée afin d'identifier les conditions réactionnelles les plus adaptées au substrat étudié, avant d'étendre ces conditions à une série de divers

<sup>382</sup> G. B. Smith, G. C. Dezeny, D. L. Hughes *et al.*, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 8151-8156.

<sup>383</sup> N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483.

(hétero)aryles. Cette optimisation, assistée par un chauffage micro-ondes, a été réalisée sur le couplage entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** et l'acide *para*-méthoxyphénylboronique (Figure 88). Ce dernier a notamment été choisi pour faciliter le suivi de la réaction par RMN



**Figure 88** : Paramètres d'optimisation du couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one et l'acide *p*-méthoxyphénylboronique.

Pour chaque essai, une masse de 300 mg de la molécule **24** a été engagée dans la réaction, le suivi réactionnel réalisé par chromatographie sur couche mince et le produit final isolé après une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice permettant le calcul d'un rendement de réaction. Au cours de cette optimisation, l'influence de la température, de la nature du solvant, de la nature de la base et de la nature et de la stœchiométrie du catalyseur au palladium ont été étudiés (Tableau 23).

Entrée	Solvant	Base, 3 équiv.	Catalyseur	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)
1	DMF	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	150	1	43
2	DMSO	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	150	1	- [a]
3	Toluene	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	110	8	- [b]
4	Dioxane	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	100	8	- [b]
5	THF	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	66	8	- [b]
6	DME	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	85	8	- [b]
7	DMF/H <sub>2</sub> O (8/2)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	100	1	46
8	DMF/H <sub>2</sub> O (8/2)	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	100	1	- [a]
9	DMF/H <sub>2</sub> O (8/2)	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	100	1	- [a]
10	DMF	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.1 equiv.	150	1	26
11	DME	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.1 equiv.	85	3	52
12	DME	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.1 equiv.	85	4	84
13	DME	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(PPh <sub>2</sub> )Cl <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	85	8	- [b]
14	DME	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	85	8	- [b]
15	DME	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub> , 0.1 equiv.	85	8	- [b]
<b>16</b>	<b>DME</b>	<b>Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 0.1 equiv.</b>	<b>85</b>	<b>2</b>	<b>88</b>
17	DME	CsF	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.1 equiv.	85	2	88
18	DME	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 0.05 equiv.	85	4	56

**Tableau 23** : Optimisation du couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one et l'acide *para*-méthoxyphénylboronique. [a] Dégradation du substrat observée lors du suivi par CCM ; [b] Conversion partielle du substrat observée lors du suivi par CCM.



Pour le premier essai d'optimisation de cette réaction, nous avons adapté le protocole décrit par M. Tremblay qui décrit l'introduction d'un groupement aryle en position 3 d'un dérivé de quinoléin-2(1*H*)-one via un couplage de Suzuki-Miyaura.<sup>377</sup> Cet essai a été effectué dans du DMF en présence de 3 équivalents de carbonate de sodium, 0,1 équivalent d'acétate de palladium et 1,2 équivalent d'acide *para*-méthoxyphénylboronique. Le mécanisme réactionnel a montré que 2 équivalents de base étaient nécessaires, nous avons donc choisi d'utiliser un excès avec 3 équivalents. Dans un tube scellé, le milieu réactionnel a été chauffé à 150 °C au micro-ondes pendant 1 h. Le produit de couplage a finalement été isolé après purification avec un rendement de 43% (entrée 1).

Une étude de l'effet de la nature du solvant sur le rendement de réaction a alors été réalisée (entrées 2 à 7). Une dégradation du substrat a été observée lorsque le DMF a été remplacé par du DMSO tandis que l'utilisation de toluène, de dioxane, de THF et de DME n'a mené qu'à une conversion partielle du substrat. Finalement, seul un mélange DMF/H<sub>2</sub>O a permis d'obtenir le produit de couplage avec un rendement de 46%. A partir de ce dernier essai (entrée 7), le carbonate de sodium a été substitué par du carbonate de potassium ou de césium, mais dans les deux cas, une dégradation du substrat a été observée (entrées 8 et 9). Le remplacement de l'acétate de palladium par du *tetrakis*-triphenylphosphine de palladium (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), n'a pas non plus permis d'obtenir le produit de couplage avec un meilleur rendement (entrée 10).

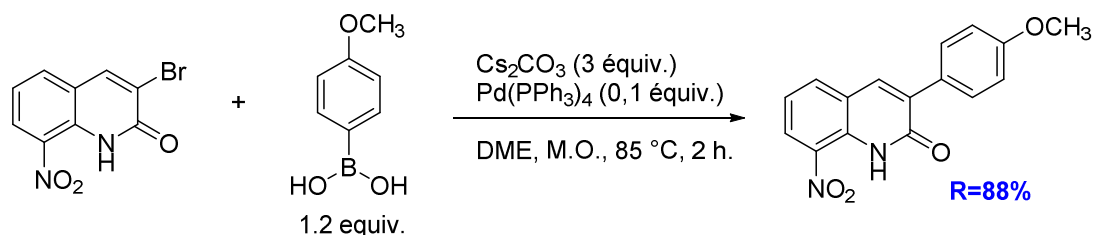
Nous avons ensuite décidé d'adapter un protocole d'E. Chong qui décrit l'introduction d'un groupement aryle sur un dérivé de pyridone substitué en position 3 par un atome de brome.<sup>384</sup> L'utilisation de DME, en présence de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> a permis de préparer le produit de couplage avec un rendement, légèrement supérieur à ceux précédemment obtenus, de 52% (entrée 11).

Le remplacement du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans ces dernières conditions de réaction a augmenté significativement la formation du produit de couplage avec un rendement de 84% après 4 h de réaction (entrée 12). L'effet de la nature du catalyseur sur la réaction a alors été étudié mais aucun des 3 nouveaux dérivés de palladium testés n'a permis de convertir tout le produit de départ (entrées 13-15), nous indiquant qu'un catalyseur de Palladium (0), le Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, semble être le plus adapté à un couplage de Suzuki-Miyaura sur ce substrat. Finalement, le remplacement du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> par du Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou du CsF a permis d'obtenir le produit de couplage avec un rendement de 88%, en seulement 2 h de réaction.

Par ailleurs, lorsque la quantité de catalyseur utilisée est diminuée de 0,1 équivalent à 0,05 équivalent, le rendement chute à 56%. Les conditions de réaction présentées à l'entrée 16 sont donc celles qui ont été retenues pour la suite du projet (Figure 89).

<sup>377</sup> M. S. Tremblay, M. Halim et D. Sames, *JACS*, **2007**, 129, 7570-7577.

<sup>384</sup> E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 6002-6005.

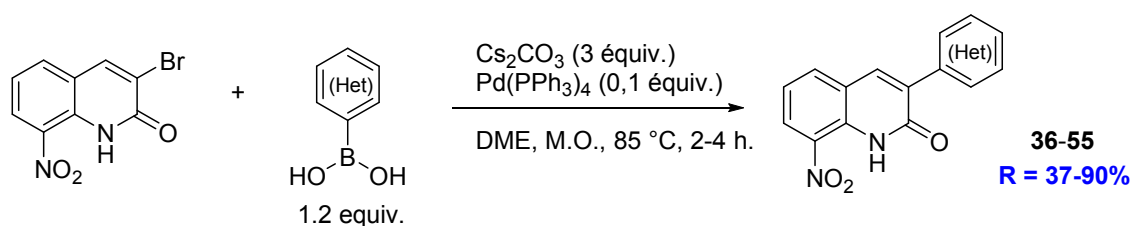


**Figure 89 :** Conditions de réaction retenues pour le couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura sur la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one.

La nature de la base semble avoir un rôle important dans cette réaction. Ainsi lorsque l'on compare les entrées 11, 12, 16 et 17, correspondant à l'utilisation de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CsF}$ , nous observons que la nature du cation influence la conversion du substrat. Il semblerait que plus la taille du cation est importante et plus le rendement est amélioré, ce qui pourrait s'expliquer par une augmentation de la solubilité en milieu organique de la base. De même, le  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  semble être le catalyseur qui donne les meilleurs résultats. Ce complexe de palladium se différencie des autres complexes testés car c'est un complexe de palladium (0) tandis que le  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , le  $\text{Pd}(\text{PPh}_2)\text{Cl}_2$  et le  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  sont tous trois des complexes de palladium (II).

### 3.1.2. Application des conditions optimisées du couplage de Suzuki-Miyaura à une série de 19 acides (hétéro)arylboroniques.

Les conditions de couplage retenues ont été appliquées à 19 autres dérivés d'acide boroniques comprenant des groupements phényles substitués en position *ortho*, *méta* et *para* par des groupements électroattracteurs ( $\text{CF}_3$  ou halogènes) et électrodonneurs ( $\text{OCH}_3$ ,  $\text{NH}_2$ ) ou des hétérocycles comme la pyridine, le furane et le thiophène. L'objectif principal étant de synthétiser une série de molécule permettant d'explorer un large espace chimique. Les molécules **36** à **55** ont ainsi été préparées et la structure de ces dérivés ainsi que les rendements correspondants sont présentés dans le tableau 24.

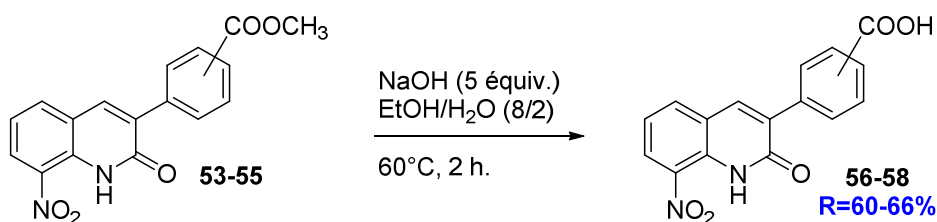


N°		Rendement (%)	N°		Rendement (%)
36		90	46		71
37		88	47		77
38		37	48		87
39		41	49		72
40		73	50		51
41		70	51		55
42		60	52		65
43		92	53		72
44		65	54		71
45		62	55		71

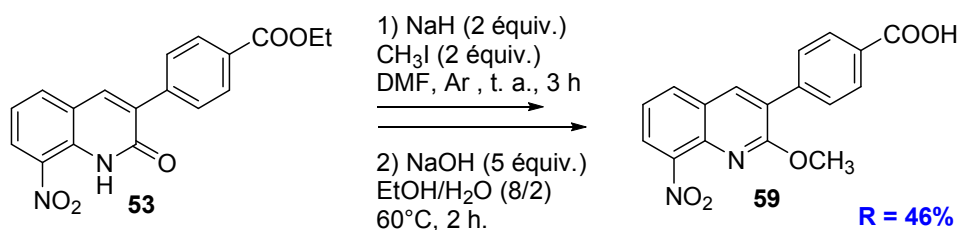
**Tableau 24 :** Structure des 20 d\u00e9riv\u00e9s issus du couplage pallado-catalys\u00e9 de Suzuki-Miyaura sur la 3-bromo-8-nitroquinolin\u00e9-2(1*H*)-one et rendements de r\u00e9action associ\u00e9s.

Ces 19 mol\u00e9cules ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9es avec des rendements qui varient entre 37 et 92%. La majorit\u00e9 de ces mol\u00e9cules ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9es avec de bons rendements, sup\u00e9rieurs ou \u00e9gaux 65% pour 14 d'entre elles. Seules les r\u00e9actions avec les acides *p*-amino- et *p*-hydroxyph\u00e9nylboroniques ont \u00e9t\u00e9 r\u00e9alis\u00e9es avec des rendements inf\u00e9rieurs \u00e0 50%.

Les acides carboxyliques **56-58** ont été préparés à partir des esters éthyliques **53-55** correspondants, par une réaction de saponification dans un mélange éthanol-eau en présence d'un excès de soude. Ces molécules ont été synthétisées avec des rendements compris entre 60 et 66%.



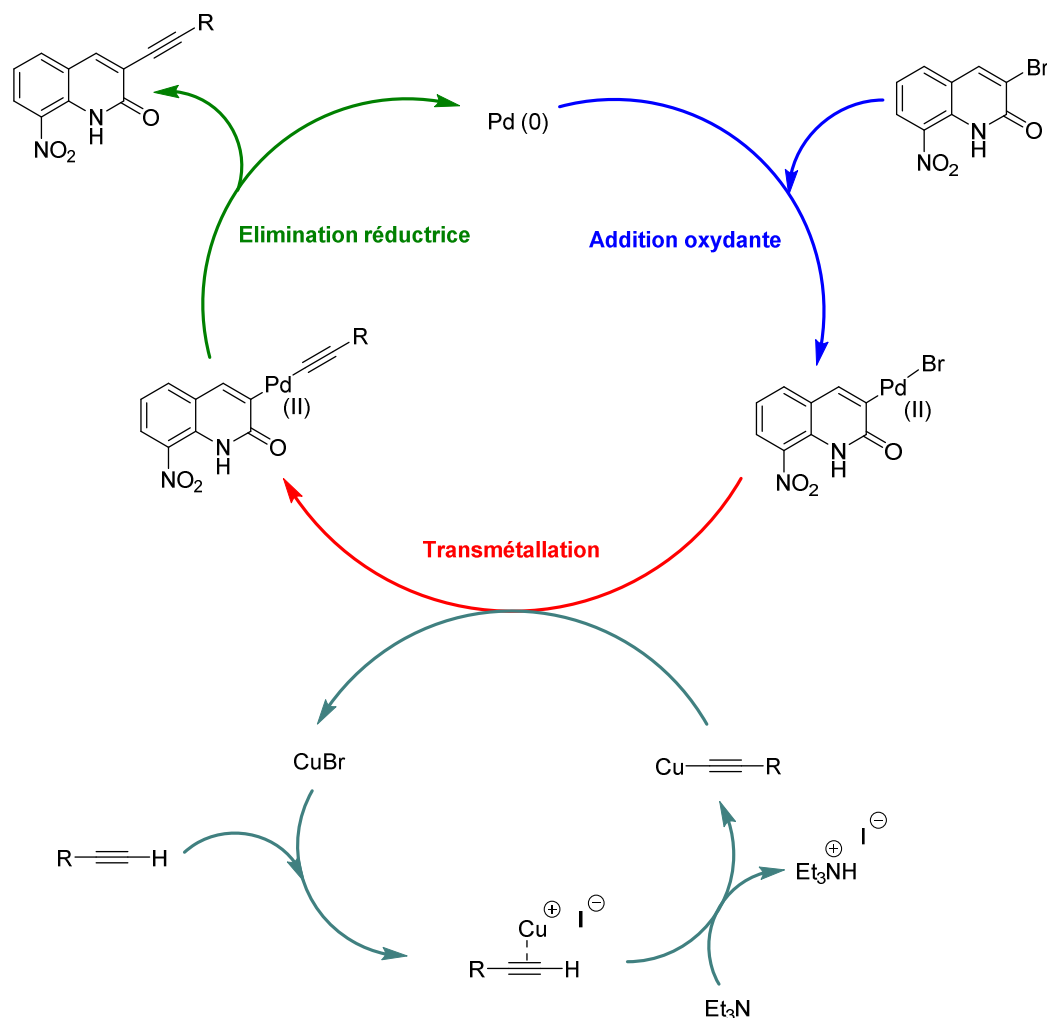
Enfin, l'analogue *O*-méthylé **59** a été préparé en deux étapes successives depuis la molécule **53** : une première étape de méthylation utilisant de l'iodure de méthyle et de l'hydrure de sodium dans du DMF à température ambiante puis une seconde étape de saponification dans un mélange éthanol/eau en présence d'un large excès de soude. La RMN <sup>13</sup>C a permis d'identifier le produit de *O*-méthylation via l'observation du déplacement chimique caractéristique de l'atome de carbone du groupement méthyle à 54,5 ppm



### 3.2. Mécanisme de la réaction de Suzuki-Miyaura.

Tout comme le couplage de Suzuki-Miyaura, le mécanisme réactionnel du couplage de Sonogashira suit un cycle catalytique de 3 étapes successives : une addition oxydante, une transmétallation et une élimination réductrice. Il a cependant comme particularité d'intégrer un co-cycle catalytique où le cuivre permet de faciliter l'étape de transmétallation (Figure 90).

- La première étape est une addition oxydante de l'atome de palladium (0) en palladium (II) au niveau de la liaison C (sp<sup>2</sup>) – halogène du substrat.
- La seconde étape est une transmétallation cuivre(I)/palladium(II) du groupement alcynyle. Le cuivre (I) va former une espèce alcynylcuivre suite à l'action d'une base qui arrache le proton de l'alcyne vrai. Le cuivre sera finalement régénéré à la suite de la transmétallation et pourra initier un nouveau co-cycle catalytique.
- La dernière étape est une élimination réductrice du palladium (II) en palladium (0) qui permet la formation du produit de couplage via la création d'une liaison Csp<sup>2</sup> – C sp. Le palladium est ainsi régénéré et il peut initier un nouveau cycle catalytique.



**Figure 90** : Mécanisme réactionnel postulé du couplage de Sonogashira sur la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

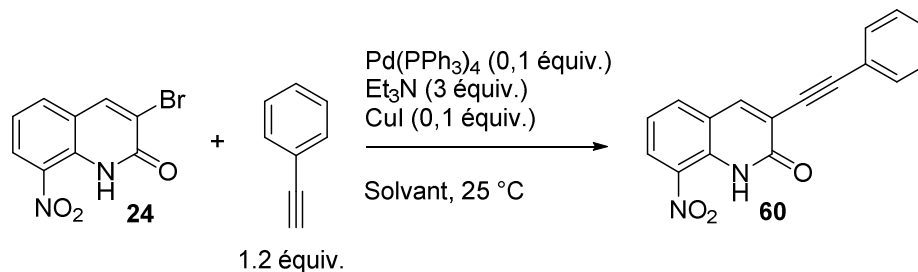
### 3.2.1. Mise au point du couplage de Sonogashira

Tout comme le couplage de Suzuki-Miyaura, la réaction de Sonogashira a nécessité une optimisation afin d'identifier les conditions de réaction adaptées au substrat utilisé. L'optimisation a été réalisée sur le couplage entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** et le phénylacétylène.

Pour chaque essai, 100 mg de la molécule **24** ont été engagés dans la réaction, le suivi réactionnel réalisé par chromatographie sur couche mince et le rendement calculé après une étape de purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. Aucune donnée n'est disponible à ce jour dans la littérature décrivant un couplage de Sonogashira en position 3 d'un dérivé de 3-bromoquinoléin-2(1H)-one. Des conditions réactionnelles classiques ont cependant été utilisées lors des études de pharmacomodulation antileishmanienne en position 4 de ce pharmacophore, comportant du DMF comme solvant, de la triéthylamine comme base, du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> comme catalyseur et du CuI comme co-catalyseur.<sup>325</sup>

<sup>325</sup> C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 2377-2386.

Ces mêmes conditions ont également été utilisées par S. Kuduk sur des dérivés de pyridine,<sup>385</sup> et nous avons choisi de les appliquer lors du couplage entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one et le phénylacétylène. Au cours de cette réaction, l'effet de la nature du solvant sur la conversion du substrat a tout d'abord été étudiée (Tableau 25).



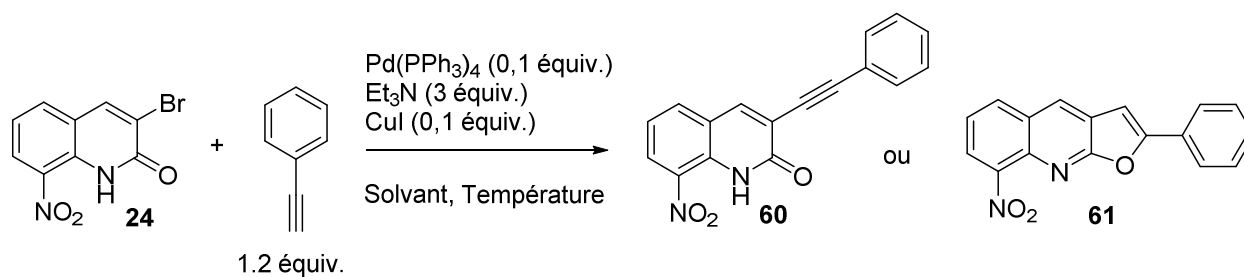
Solvant	Rendement <b>60</b> (%)	Temps (h)
DMF	_[a]	48
THF	_[a]	48
Et <sub>3</sub> N	_[a]	48
DME	<b>56</b>	0,25

[a] Conversion partielle du substrat observée lors du suivi par CCM.

**Tableau 25 :** Etude de l'influence du solvant sur le couplage pallado-catalysé de Sonogashira en série 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Une absence de conversion après 48 h a été observée à température ambiante lorsque la réaction a eu lieu dans du DMF, dans du THF ou dans de la triéthylamine. Cependant lorsque le DME a été utilisé, le produit de couplage **60** a été isolé avec un rendement de 56%. L'effet de la température sur la conversion du substrat a ensuite été étudié, afin de compléter ces premiers résultats (Tableau 26).

<sup>385</sup> S. D. Kuduk, J. W. Skudlarek, C. N. Di Marco *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 1784-1789.



Solvant	Température (°C)	Rendement <b>60</b> (%)	Rendement <b>61</b> (%)	Temps (h)
DME	0	–[a]	–[a]	48
DME	15	<b>72</b>	0	1.5
DME	40	0	<b>51</b>	0.5
DMF	25	–[a]	–[a]	48
DMF	40	0	<b>56</b>	36

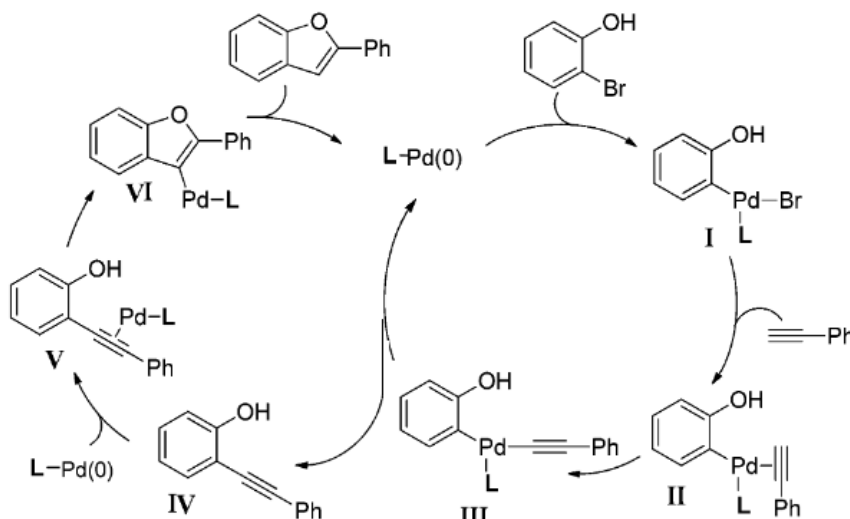
[a] Conversion partielle du substrat observée lors du suivi par CCM.

**Tableau 26 :** Etude de l'influence de la température sur le couplage pallado-catalysé de Sonogashira entre la 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one et le phénylacétylène.

Tout comme la nature du solvant, la température a une forte influence sur la réaction de Sonogashira. Si une conversion partielle a été observée à 0 °C, lorsque la réaction a eu lieu à 15 °C, le produit de couplage **60** a pu être isolé avec un rendement amélioré de 72% en comparaison avec l'essai précédent réalisé à 25 °C (56%). De manière plus surprenante, lorsque la réaction a été chauffée dans le DME à 40 °C, un nouveau produit de couplage **61** s'est formé avec un rendement de 51% : la 8-nitro-2-phénylfuro[2,3-*b*]quinoléine. Ce produit de couplage **61** a également été formé lorsque la réaction a été chauffée à 40 °C dans le DMF avec un rendement similaire de 56%. Enfin, pour souligner davantage l'importance de la température dans la formation de la molécule **61**, des essais de recristallisation à chaud dans l'acétonitrile de la molécule **60** ont provoqué une cyclisation intramoléculaire menant à la molécule **61**, ce qui démontre une forte instabilité de cette molécule.



Si la formation de dérivés de furoquinoléines à la suite d'un couplage de Sonogashira n'est pas décrite dans la littérature, ce type de réaction a déjà été rapporté en série pyridinone et benzénique.<sup>386,387</sup> Zhou et coll. proposent ainsi le mécanisme réactionnel ci-dessous, potentiellement applicable à notre substrat considéré sous sa forme lactime (Figure 91).<sup>388</sup>



**Figure 91** : Mécanisme réactionnel postulé de la formation de benzo[*b*]furane *via* un couplage de Sonogashira sur des dérivés d'*ortho*-halophénols.<sup>388</sup>

Il semblerait qu'à la suite d'un premier cycle catalytique qui mène à la formation du produit de couplage attendu, le catalyseur de palladium se complexe avec l'alcyne bisubstitué. Le groupement hydroxy situé en position *ortho* de la triple liaison attaque alors celle-ci, menant à la cyclisation intramoléculaire et à la formation du benzo[*b*]furane. Le palladium (0) est ensuite à nouveau régénéré *via* une élimination réductrice et peut initier un nouveau cycle catalytique. Cependant, il semblerait également que l'apport d'énergie *via* un chauffage du milieu réactionnel favorise la formation du composé bicyclique.

Finalement, en raison de l'instabilité de la molécule **60** et du manque de solubilité en milieu biologique de la molécule **61** lors des évaluations biologiques qui seront présentées dans la suite de ce chapitre, nous avons décidé de ne pas poursuivre nos travaux de pharmacomodulation utilisant la réaction de Sonogashira.

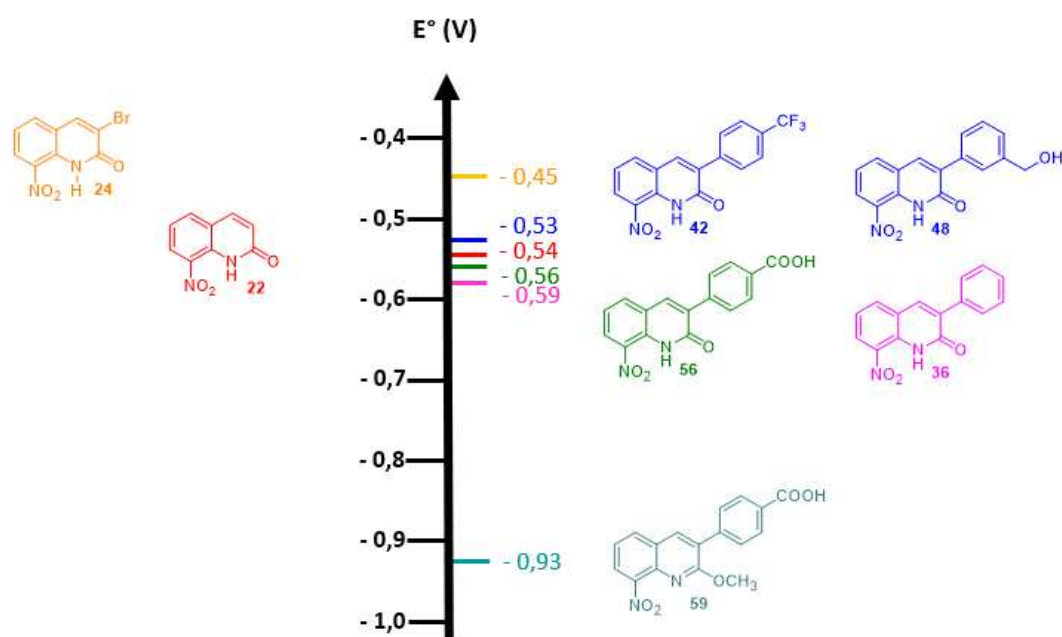
<sup>386</sup> T. Sakamoto, Y. Kondo, R. Watanabe *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 2719.

<sup>387</sup> H. Van de Poël, G. Guillaumet et M.C. Viaux-Massuard, *Heterocycles* **2002**, 57, 55-71.

<sup>388</sup> R. Zhou, W. Wang, Z. Jiang *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 6023-6026.

### 3.3. Analyse électrochimique des molécules obtenues par couplage pallado-catalysé.

Afin de poursuivre l'étude du pharmacophore en série 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one, la mesure du potentiel de réduction de quelques dérivés de cette nouvelle série a été effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre précédent. Notre objectif est ici d'étudier l'effet de l'introduction d'un groupement aryle en position 3 du pharmacophore sur les potentiels de réduction correspondants au couple  $\text{NO}_2/\text{NO}_2^\bullet$  (Figure 92).



**Figure 92 :** Etude de l'effet de l'introduction d'un groupement aryle en position 3 du pharmacophore sur les potentiels de réduction en série 8-nitroquinoléin-(1*H*)-one.

Le potentiel de réduction de ces nouveaux dérivés varie entre - 0,53 et - 0,59 V. Ces potentiels sont similaires à celui de la molécule **22** qui porte un proton en position 3 et légèrement inférieurs à celui de la molécule **24**, substituée en cette même position par un atome de brome. L'introduction d'un groupement aryle en position 3 de ce pharmacophore a donc peu d'effet sur les  $E^\circ$ .

Par ailleurs, le dérivé *O*-méthylé **59** possède un potentiel de réduction significativement diminué (- 0,93 V). Cette variation de potentiel est principalement due à la suppression de la liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène du motif lactame et l'oxygène du groupement nitro, une liaison qui contribue à appauvrir le cycle en électrons et donc à rendre ces dérivés plus facilement réductibles.

#### 4. Evaluation de l'activité biologique *in vitro* des molécules synthétisées.

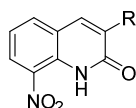
Toutes les molécules préparées dans le cadre de ce travail de synthèse organique ont été évaluées sur la lignée humaine HepG2, sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*. Nous avons suivi la même méthode de criblage primaire et secondaire que celle décrite dans le chapitre précédent.

##### 4.1. Evaluation de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2.

Les résultats de l'évaluation de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2 sont présentés dans le tableau 27. Ces premiers résultats biologiques indiquent que l'introduction d'un groupement aryle en position 3 de ce pharmacophore mène à des molécules généralement peu solubles en milieu biologique (molécules **36** à **46**). Cela est particulièrement le cas lorsque le cycle aromatique introduit est substitué par des groupements plutôt lipophiles comme des atomes d'halogènes (molécule **40** et **41**) ou un groupement trifluorométhyle (molécule **42**). L'introduction d'un hétérocycle induit généralement une perte de solubilité en milieu biologique, les CC<sub>50</sub> des dérivés de furane, de thiophène ou de pyridine n'ont ainsi pas pu être déterminées (molécules **43**, **44** et **46**), excepté pour la molécule **45** qui possède une CC<sub>50</sub> supérieure à 25 µM. La présence d'un motif ester méthylique en différentes positions du phényle mène à des dérivés insolubles en milieu biologique (molécule **53**) mais aussi insolubles dans le DMSO (molécules **54** et **55**). Par ailleurs, le dérivé furoquinoléine **61**, synthétisé *via* un couplage de Sonogashira, a également montré un manque de solubilité en milieu aqueux.

La solubilité en milieu aqueux a été légèrement améliorée pour les composés portant un groupement phényle ou pyridin-3-yl (molécules **36** et **45**) avec des CC<sub>50</sub> respectives supérieures à 12 et 25 µM. Par ailleurs, les molécules possédant un motif phényle substitué par des groupements hydrophiles comme les groupements hydroxyméthyle et aldéhyde (molécules **47-49** et **50-52**), ou ionisables comme le groupement acide carboxylique (molécules **56-59**) ont présenté une bonne solubilité en milieu aqueux. Cela est particulièrement le cas pour les dérivés portant un groupement acide carboxylique qui possèdent des CC<sub>50</sub> supérieures à 100 µM. Ainsi, parmi tous les dérivés synthétisés, la molécule **50** possédant un groupement aldéhyde en position *para* du phényle est la plus cytotoxique de cette série avec une CC<sub>50</sub> de 30 µM.

Ainsi, par comparaison avec le hit antikinétoplastidés **24** qui possède une CC<sub>50</sub> de 92 µM, les molécules qui présentent le meilleur profil de cytotoxicité sont celles qui possèdent une fonction acide carboxylique (molécules **56**, **57**, **58** et **59**) avec des CC<sub>50</sub> supérieures à 100 µM.



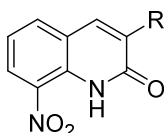
Numéro	R	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	Numéro	R	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)
36		>12	51		> 100
37		>6	52		>50
38		>3	53		>12.5
39		>3	54		NS
40		>3	55		NS
41		>6	56		120 ± 7
42		>6	57		>100
43		>6	58		>100
44		>3	22	H	164 ± 28
45		>25	24	Br	92 ± 13
46		NS	 59		>100
47		>25	Doxorubicine		0,2 ± 0,02
48		>25	Amphotéricine B		7 ± 0,25
49		>100	Miltéfosine		84,5 ± 8,8
			Fexinidazole		>200
50		30 ± 3.7	Suramine		>200
			Eflornithine		>200


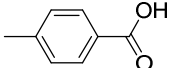

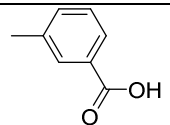
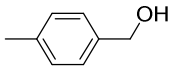
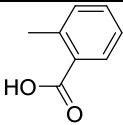
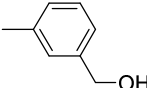
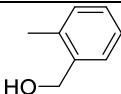
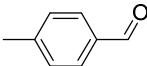
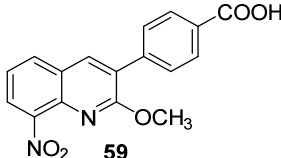
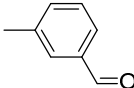

Tableau 27 : Evaluation de la cytotoxicité des nouveaux dérivés substitués en position 3 du pharmacophore.

En bleu sont représentées les CC<sub>50</sub> des molécules les plus solubles en milieu biologique et en rouge les hits précédemment identifiés.

## 4.2. Evaluation de l'activité antileishmanienne.

Toutes les molécules qui ont présenté une solubilité en milieu aqueux supérieure à 12  $\mu\text{M}$  lors des tests de cytotoxicité ont ensuite été évaluées sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum*, soit 12 molécules sur 26. Les résultats sont présentés dans le tableau 28.



Numéro	R	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)	Numéro	R	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)
36		>12	56		>100
45		> 50	57		>100
47		>25	58		>100
48		29,3 ± 4,2	22	H	15.5 ± 0.5
49		22 ± 2,0	24	Br	7,1 ± 1,5
50		35 ± 1,7	 59		12,8 ± 2,0
51		10,2 ± 0,6			
52		9,8 ± 1,2	Amphotéricine B		0,06 ± 0,001
			Miltéfosine		0,8 ± 0,2
			Fexinidazole		3,3 ± 0,7

**Tableau 28 :** Evaluation de l'activité antileishmanienne sur la forme amastigote axénique de *L.infantum*.

En bleu sont représentées les CI<sub>50</sub> des molécules actives (CI<sub>50</sub>>20  $\mu\text{M}$ ), en rouge celles des hits précédemment identifiés.

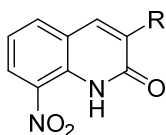
Parmi les 12 molécules testées, seules les molécules portant en position 3 un motif phényle substitué par un groupement aldéhyde (molécules **51** et **52**) sont actives sur *Leishmania infantum* avec des  $CI_{50}$  de respectivement 10,2 et 9,8  $\mu$ M. Cependant les groupements aldéhydes sont des groupements électrophiles qui peuvent réagir avec les biomolécules nucléophiles de la cellule et être considérés comme des faux positifs. De plus, ces groupements sont généralement métabolisés via des réactions d'oxydations par les cytochromes P450 menant aux dérivés acides carboxyliques correspondants, or les dérivés portant un groupement acide carboxylique sont inactifs sur ce parasite (molécules **56-58**). Tous les autres dérivés présentent une faible activité leishmanicide avec des  $CI_{50}$  comprises entre 22 et 35  $\mu$ M, soit entre 3 et 5 fois plus élevées que celle du hit initial **24**. Plus surprenant, l'analogue *O*-méthylé **59** possède une  $CI_{50}$  de 12,8  $\mu$ M alors que tous les dérivés *O*-méthylés synthétisés jusqu'à présent dans cette série étaient inactifs sur *L. infantum*.

L'introduction d'un groupement aryle en position 3 de ce pharmacophore ne semble donc pas favorable à une bonne activité antileishmanienne. En effet, aucune molécule de cette série ne présente un meilleur profil d'activité antileishmanienne que celui du hit antikinétoplastidés **24** ou que ceux des molécules antileishmaniennes de référence.

#### 4.3. Evaluation de l'activité anti-*Trypanosoma*.

Toutes les molécules qui ont été testées sur la forme amastigote de *L. infantum*, ont également été testées sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei*. Les résultats sont présentés dans le tableau 29 et les valeurs de  $CI_{50}$  comparées à celles des 3 molécules anti-*Trypanosoma* de référence à savoir l'eflornithine, la suramine et le fexinidazole.

Excepté la molécule **58**, tous les dérivés testés dans cette série sont actifs sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei*. Ces molécules ont ainsi des  $CI_{50}$  comprises entre 0,5 et 7,5  $\mu$ M, des valeurs plus basses que celle de l'eflornithine (15,8  $\mu$ M) et relativement proches de celle du fexinidazole (0,4  $\mu$ M) pour certaines d'entre elles. Parmi ces dérivés, 5 molécules sont particulièrement intéressantes avec des  $CI_{50}$  inférieures à 2,5  $\mu$ M (en bleu dans le tableau).



Numéro	R	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. (μM)	Numéro	R	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. (μM)
36		4,7 ± 2,7	56		1,5 ± 0,2
45		2,8 ± 0,8	57		7,5 ± 1,0
47		1,9 ± 0,3	58		>50
48		1,5 ± 0,3	22	H	23,4 ± 5,7
49		7,2 ± 0,6	24	Br	1,9 ± 0,44
50		0,5 ± 0,1	 <b>59</b>		2,2 ± 0,5
51		5,6 ± 0,4			0,03 ± 0,009
52		7,5 ± 0,4			15,8 ± 2,1
					0,4 ± 0,18

**Tableau 29 :** Evaluation de l'activité anti-*Trypanosoma* sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei*. En bleu sont représentées les CI<sub>50</sub> des molécules actives (CI<sub>50</sub>>2,5 μM), en rouge celles des hits précédemment identifiés.

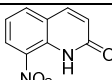
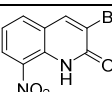
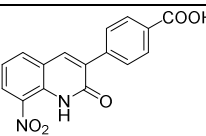
La substitution du groupement phényle introduit en position 3 du pharmacophore semble avoir un effet sur l'activité anti-*Trypanosoma*. En effet, lorsque le substituant est situé en position *ortho*, les activités trypanocides sont généralement plus basses que lorsqu'il est en position *meta* ou *para* du cycle. Cela est particulièrement visible pour les molécules possédant un groupement acide carboxylique : lorsque ce dernier est en position *para* ou *meta*, les molécules sont actives (molécules **56** et **57**) tandis que lorsqu'il est en position *ortho*, le dérivé perd son activité anti-*Trypanosoma* (molécule **58**). Par ailleurs, les molécules substituées en position *para* du groupement phényle sont généralement les plus actives. Ainsi la molécule **50** est 11 fois plus active que la molécule **51** tandis que la molécule **56** est 5 fois plus active que la molécule **57**.



Les deux molécules les plus actives sur *Trypanosoma brucei brucei* sont les molécules **50** et **56** avec des  $CI_{50}$  respectives de 0,5  $\mu$ M et 1,5  $\mu$ M. Cependant, la molécule **50** est plus cytotoxique que la molécule **56** sur la lignée humaine HepG2 avec une  $CC_{50}$  de 30  $\mu$ M contre 120  $\mu$ M pour la seconde citée, et a donc un moins bon index de sélectivité (respectivement de 60 et 80). Par comparaison avec le hit identifié dans le chapitre précédent (molécule **24**), la molécule **56** est moins cytotoxique et aussi active sur *T. b. brucei* ce qui se traduit par une augmentation de l'index de sélectivité de 48 à 80. Ainsi la molécule **56** est moins active que la suramine, mais plus active que l'éflornithine. Par ailleurs, le composé **56** est environ 3 fois moins actif que le fexinidazole, candidat-médicament contre la THA, et possède un index de sélectivité également inférieur (respectivement de 80 et > 500).

#### 4.4. Bilan des RSA

A la suite de ces différents résultats d'activités biologiques, la molécule **56** a été identifiée comme un nouveau hit dans cette série de molécules substituées en position 3 par un groupement aromatique. Son profil biologique complet est présenté dans le tableau 30 et comparé à celui des molécule **22**, **24** ainsi qu'à ceux des molécules de références, actives sur *Trypanosoma brucei brucei*.

N°	Structure	$CC_{50}$ HepG2 ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ <i>L. inf</i> ama. axénique ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ <i>T. b.</i> <i>brucei</i> trypoma. ( $\mu$ M)	IS $CC_{50}$ HepG2/ $CI_{50}$ <i>T. b.</i> <i>brucei</i>
<b>22</b>		164 $\pm$ 28	15,5 $\pm$ 0,5	23,4 $\pm$ 5,7	7
<b>24</b>		92 $\pm$ 13	7,1 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 0,4	48,4
<b>56</b>		120 $\pm$ 7	>100	1,5 $\pm$ 0,2	80
Suramine		> 100	-	0,03 $\pm$ 0,009	> 3333
Eflornithine		> 100	-	15,8 $\pm$ 2,1	> 6
Fexinidazole		> 200	3,4 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,2	> 500

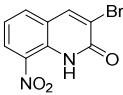
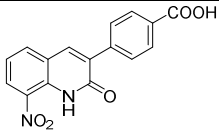
**Tableau 30** : Profil d'activité biologique des molécules hit identifiées en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones.

La molécule **56** possède donc une cytotoxicité intermédiaire entre celle de la molécule **22** et de la molécule **24**. Cependant, à la différence des autres dérivés de cette série et du fexinidazole, cette molécule possède une activité anti-*Trypanosoma* sélective. Par ailleurs, son index de sélectivité sur *Trypanosoma brucei brucei* est 10 plus élevé que celui de la molécule **22** et près de 2 fois plus élevé que celui de la molécule **24**.

Lors de l'évaluation antiparasitaire des dérivés de cette série, nous avons observé que la molécule **56** est active sur *T. b. brucei* mais inactive sur *L. infantum*. Un second élément intéressant est que l'analogue *O*-méthylé **59** de la molécule **56** est actif sur *T. b. brucei* avec une  $CI_{50}$  de 2,2  $\mu$ M, mais également sur *L. infantum* avec une  $CI_{50}$  de 12,8  $\mu$ M. Ces deux éléments semblent indiquer que l'introduction d'un groupement aryle en position 3 de ce pharmacophore pourrait mener à des dérivés sélectifs de la nitroréductase de *Trypanosoma*.

#### 4.4.1. Evaluation biologique sur des souches de *T. b. brucei* qui surexpriment la nitroréductase de *Trypanosoma* (NTR1).

Des études mécanistiques ont alors été réalisées sur la molécule **56** via l'évaluation biologique sur des souches de *T. b. brucei* qui surexpriment la nitroréductase de type 1. Pour cela, une comparaison est effectuée entre l'activité anti-*Trypanosoma* sur une souche sauvage et l'activité sur une souche qui surexprime la NTR. Les résultats sont présentés dans le tableau 31 et comparés à ceux du hit antikinétoplastidés **24** et du nifurtimox.

N°	Structure	$CI_{50}$ <i>T. b. brucei</i> trypoma. sauvage ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ <i>T. b. brucei</i> trypoma. NTR <sup>SE</sup> ( $\mu$ M)
<b>24</b>		$17,7 \pm 1,0$	$3,9 \pm 0,1$ (x4,5)
<b>56</b>		$5,4 \pm 0,12$	$4,2 \pm 0,2$ (x1,3)
	Nifurtimox	$1,87 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,05$ (x3,1)

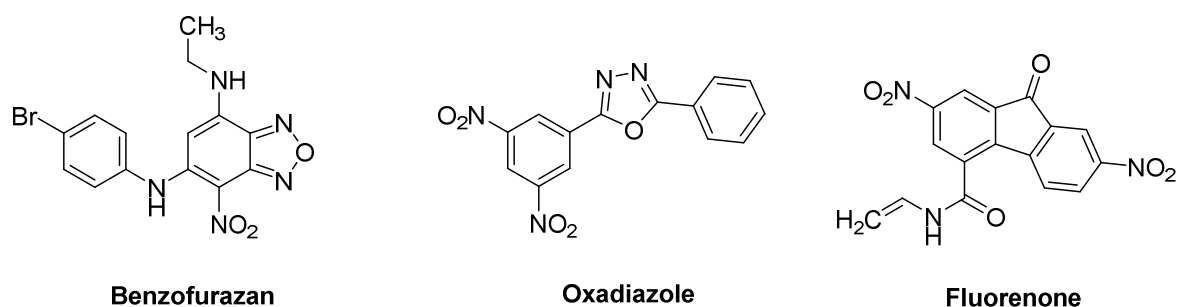
**Tableau 31 :** Activités biologiques des molécules **24**, **56** et du nifurtimox sur une souche sauvage de *T. brucei brucei* et sur une souche surexprimant la NTR de type 1.

Si la molécule **24** est effectivement bioactivée par la NTR de *Trypanosoma* avec une activité 4,5 fois plus importante sur la souche qui surexprime la NTR par rapport à son activité sur la souche sauvage, l'activité de la molécule **56** est uniquement augmentée d'un facteur 1,3 entre ces deux souches. Par ailleurs, le nifurtimox qui est connu pour être bioactivé par la NTR a une activité améliorée d'un facteur 3,1 sur la

souche qui surexprime la NTR en comparaison avec celle de la souche sauvage. Ce résultat indique que la molécule **56** est moins bioactivée que la molécule **24** par la nitroréductase trypanosomale.

Pour mémoire, lors des évaluations antiparasitaires précédentes, nous avons observé que la molécule **56** est active sur *Trypanosoma brucei brucei* mais inactive sur *Leishmania infantum*. Par ailleurs, son analogue *O*-méthylé **59** est actif sur les deux parasites. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'introduction d'un groupement phényle en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one conduit à des dérivés sélectivement bioactivés par la NTR de *Trypanosoma*. Cependant, la  $CI_{50}$  de la molécule **56** sur une souche de *T. b. b.* qui surexprime la NTR1 n'est augmentée que d'un facteur 1,3 par rapport à celle de la souche sauvage, ce qui suggère qu'elle n'est que partiellement bioactivée par la NTR de *Trypanosoma*. Ce dernier élément suggère que l'introduction d'un groupement aryle en position 3 du noyau conduit à une série de molécules qui pourrait agir sur une autre cible que la nitroréductase de *Trypanosoma*. Afin de vérifier cette hypothèse, un analogue de la molécule **56** sans le groupement nitro pourrait être synthétisé et évalué. Autre possibilité, afin d'étudier l'influence du groupement nitro sur l'activité anti-*Trypanosoma* tout en potentiellement conservant la liaison hydrogène intramoléculaire, un analogue de la molécule **56** dont le groupement nitro est remplacé par un groupement acide carboxylique pourrait être synthétisé.

Pour mieux comprendre la sélectivité d'action de cette molécule sur *Trypanosoma*, l'étude mécanistique sur d'autres cibles parasitaires pourrait aussi être réalisée. Parmi les cibles parasitaires de dérivés nitrohétérocycliques récemment identifiés, la *S*-adénosylméthionine décarboxylase a été récemment découverte lors d'un criblage à haut débit couplé à de la spectrométrie de masse.<sup>389</sup> Cette cible, dont plusieurs inhibiteurs connus sont des molécules nitroaromatiques (Figure 93), pourrait donc être considérée lors de futures études visant à comprendre le mécanisme d'action de ce nouveau hit anti-*Trypanosoma*.



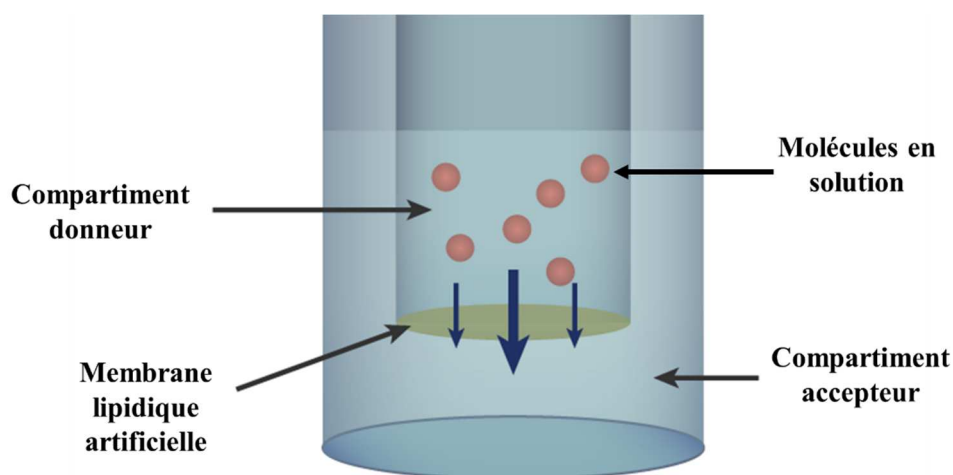
**Figure 93** : Exemples de structures de molécules nitroaromatiques, inhibiteurs de la *S*-adénosylméthionine décarboxylase

<sup>389</sup> O. A. Volkov, C. C. Cosner, A. J. Brockway, et al., *ACS Infect. Dis.*, **2017**, 3, 512-526.

#### 4.4.2. Etude du passage de la barrière hémato-encéphalique.

La Trypanosomiase humaine africaine est une maladie qui a un premier stade hémolympatique et un second stade méningo-encéphalique, responsable du décès du patient. Lors du développement pré-clinique d'une molécule anti-*Trypanosoma*, une propriété importante à déterminer est donc sa faculté à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Il existe plusieurs tests pharmacocinétiques *in vitro* qui permettent d'évaluer le franchissement de ces barrières biologiques. Le test PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) est l'un d'entre eux (Figure 94). Il permet la détermination de la perméabilité d'une molécule, depuis un premier compartiment vers un second, à travers une membrane artificielle constituée de phospholipides solubilisés dans un solvant organique.<sup>390</sup>



**Figure 94 :** Principe du test PAMPA.(Cyprotex.com)

Ce test évalue particulièrement la diffusion passive d'un composé à travers une bicouche lipidique et les résultats sont données sous forme de surface de diffusion par unité de temps. Ce test PAMPA évaluant le franchissement de la BHE a été réalisé sur la molécule **56**, la théophylline étant le contrôle négatif et la corticostérone étant le contrôle positif (Tableau 32).

Nom	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	$\log\text{Pe}$	$\text{Pe}$ ( $10^{-6}\text{cm/s}$ )	Interprétation
Molécule <b>56</b>	50	$-6,41 \pm 0,32$	$0,46 \pm 0,23$	<b>Ne diffuse pas</b>
Théophylline	250	$-6,26 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	<b>Ne diffuse pas</b>
Corticostérone	100	$-4,86 \pm 0,07$	$13,86 \pm 2,20$	<b>Diffuse</b>

**Tableau 32 :** Evaluation de la perméabilité de la molécule **56** pour la BHE par le test PAMPA.

<sup>390</sup> M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1007-1010.

Le coefficient de perméabilité (Pe) a été calculé pour chaque molécule testée via la différence de concentration entre le premier compartiment où elle est solubilisée et le second compartiment où elle est également présente en cas de franchissement de la membrane artificielle. Ainsi, la molécule **56** possède un Pe plus faible que celui de la théophylline indiquant qu'elle ne franchit pas la BHE. Par comparaison, le Pe de la corticostérone, une molécule qui diffuse à travers cette membrane, est 30 fois supérieur à celui de la molécule **56**. La capacité d'une molécule à franchir la barrière hémato-encéphalique est dépendante de ses caractéristiques physico-chimiques.<sup>391</sup> Ainsi, un poids moléculaire faible (inférieur à 450 g/mol), une faible surface polaire (inférieur à 90 Å<sup>2</sup>) et la présence de peu de groupements donneurs de liaisons H sont favorables à un bon franchissement de la BHE. Or la molécule **56**, malgré un poids moléculaire de 310 g/mol, possède un groupement acide carboxylique, groupement polaire chargé négativement à pH physiologique. Ce groupement est probablement à l'origine d'une faible diffusion à travers la membrane artificielle mimant la barrière hémato-encéphalique.

## 5. Conclusion

Au cours de ce travail de pharmacomodulation anti-*Trypanosomatidae* en position 3 du pharmacophore, 26 nouvelles molécules ont été synthétisées via des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira.<sup>392</sup> Une optimisation des conditions réactionnelles du couplage de Suzuki a permis la préparation de 24 molécules originales substituées en position 3 par un (hétéro)cycle aromatique.

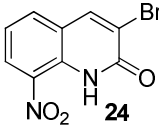
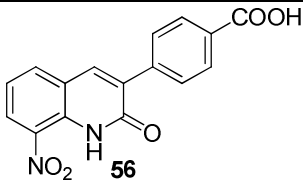
Le couplage de Sonogashira sur la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** a également été optimisé et a mené à la synthèse d'un dérivé **60** portant un groupement alcynyle en position 3 mais aussi de façon plus surprenante à la furo[2,3-*b*]quinoléine **61**. La température est un facteur clé de cette réaction, un chauffage à 40 °C provoquant la cyclisation intramoléculaire menant au dérivé tricyclique. Cependant, au vu de l'instabilité de la molécule **60** et de la faible solubilité en milieu biologique de la molécule **61**, la synthèse de dérivés de cette série a été arrêtée.

Une étude électrochimique a été réalisée via la mesure des potentiels de réduction des molécules synthétisées au cours de ce travail de pharmacochimie, indiquant que la substitution de la position 3 du pharmacophore par un groupement aryle a peu d'effet sur le potentiel de réduction avec des valeurs comprises entre -0,53 et -0,59 V, la molécule non substituée **22** ayant un potentiel de -0,54 V.

Toutes les molécules synthétisées au cours de ce travail ont ensuite été évaluées sur la ligne humaine HepG2. Seules les 12 molécules suffisamment solubles et non cytotoxiques ont alors été testées sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*. La molécule **56** a ainsi été identifiée comme un hit sélectif anti-*Trypanosoma*.

<sup>391</sup> H. Van de Waterbeemd, G. Camenisch, G. Folkers *et al.*, *J. Drug Target*, **1998**, 6, 151-165.

<sup>392</sup> J. Pedron, C. Boudot, S. Bourgeade-Delmas *et al.*, *ChemMedChem*, **2018**, 13, 2217-2228.

	 <chem>O=C1C=C(C2=CC=CC=C2Br)Nc3cc([N+](=O)[O-])ccc31</chem> <b>24</b>	 <chem>O=C1C=C(C2=CC=CC=C2C(=O)O)Nc3cc([N+](=O)[O-])ccc31</chem> <b>56</b>
CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	92 ± 13	<b>120 ± 7</b>
CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. Axénique (μM)	7,1 ± 1,5	<b>&gt;100</b>
CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. (μM)	1,9 ± 0.44	<b>1,5 ± 0.2</b>
IS <i>Trypanosoma</i>	48	<b>80</b>
Bioactivation NTR1 <i>Trypanosoma</i>	Oui	<b>Partielle</b>
E° (V)	- 0,45	- 0,56
Test PAMPA BHE	-	<b>Ne diffuse pas</b>

**Tableau 33** : Comparaison du profil biologique du hit anti-kinétoplastidés **24** avec le hit anti-*Trypanosoma* **56**.

L'introduction d'un groupement *para*-carboxyphényle en position 3 de ce pharmacophore induit une perte de l'activité antileishmanienne tout en gardant un niveau similaire d'activité anti-*Trypanosoma*, en comparaison avec la molécule **24**. La présence de ce groupement acide carboxylique permet d'améliorer la solubilité en milieu aqueux qui a été un problème lors de l'évaluation biologique des molécules de cette série. Cette substitution semble également améliorer légèrement le profil de cytotoxicité avec une CC<sub>50</sub> sur la lignée HepG2 qui augmente de 92 à 120 μM entre la molécule **24** et la molécule **56**, ce qui se traduit par une amélioration de l'index de sélectivité sur *Trypanosoma* (de 48 à 80). De façon intéressante, la molécule **56** est active sur *T. b. brucei* et inactive sur *L. infantum* tandis que son analogue méthylé est actif sur les deux parasites. De plus, si le hit antikinétoplastidés **24** est un substrat de la NTR de *Trypanosoma*, la molécule **56** n'est que partiellement bioactivée par cette enzyme, ce qui suggère que l'introduction d'un groupement aryle en position 3 du pharmacophore pourrait mener à une série de molécules qui agit sur une autre cible parasitaire chez *Trypanosoma*. Cependant, la présence du groupement acide carboxylique sur la molécule **56** induit également une faible diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique, ce qui est défavorable au développement de cette molécule comme agent anti-*Trypanosoma*.

L'activité anti-*Trypanosoma* prometteuse de la molécule **56** couplée à une cytotoxicité supérieure à 100 μM a confirmé l'importance de l'introduction d'un substituant en position 3 de ce pharmacophore 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one dans la lignée du hit antikinétoplastidés **24**. Des résultats présentés au cours du chapitre 3 avaient également mis en lumière que la substitution de la position 6 de ce noyau conduisait à des dérivés actifs sur *Trypanosoma*. Ainsi, de nouveaux travaux seront présentés dans le prochain chapitre incluant la synthèse et l'évaluation biologique de molécules substituées en position 6 par des groupements électroattracteurs et en position 3 par les meilleurs groupements identifiés jusqu'à maintenant.

## PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 4

### 1. Méthodes Générales

Les méthodes générales sont présentées dans la partie expérimentale du chapitre 3, page 144.

### 2. Partie Chimie

#### Protocole général pour la préparation des composés 36-55<sup>384</sup>

Dans un tube scellé de 25 mL, 300 mg de 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** (1,1 mmol, 1 équiv.), 1,1 g de carbonate de césium (3,3 mmol, 3 équiv.), 128 mg de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,12 mmol, 128 mg) et 1,2 equiv. de l'acide boronique correspondant ont été ajoutés à un tube scellé de 25 mL. Sous atmosphère inerte (Argon), 10 mL de diméthoxyéthane sec ont alors été ajoutés. Les milieux réactionnels ont ensuite été chauffés à 100°C dans un réacteur micro-onde (programme standard) pendant 2 à 4 h. Les mélanges réactionnels ont été versés dans un bécher d'eau et extraits trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL). Les phases organiques résultantes ont successivement été lavées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporées sous pression réduite. Les bruts réactionnels ont finalement été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange adapté et recristallisées si nécessaire pour donner les composés **36-55**.

#### Préparation de la 8-nitro-3-phénylquinoléin-2(1*H*)-one **36**.

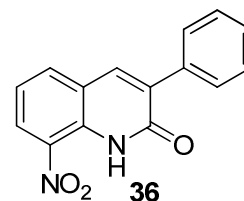
Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Apparence : Poudre jaune.

Tdec : 177 °C.

Masse Molaire : 266,26 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 267.0770, trouvée 267.0762.



<sup>384</sup> E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 6002-6005.



La molécule **36** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (97/3), isolée et recristallisée dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec 90% de rendement (0,99 mmol, 264 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,31-7,35 (m, 1H, H6) ; 7,41-7,50 (m, 3H, H3', H4' et H5') ; 7,75-7,77 (m, 2H, H2' et H6') ; 7,91 (s, 1H, H4) ; 7,94 (dd, 1H,  $J=7,6$  et  $1,4$  Hz, H5) ; 8,49 (dd, 1H,  $J=8,4$  et  $1,4$  Hz, H7) ; 11,40 (br s, 1H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 121,4 (CH) ; 122,7 (C) ; 127,3 (CH) ; 128,5 (2xCH) ; 128,7 (2xCH) ; 129,1 (CH) ; 132,7 (C) ; 133,1 (C) ; 134,5 (C) ; 134,6 (C) ; 135,6 (CH) ; 136,7 (CH) ; 161,0 (C).

### Préparation de la 3-(4-méthoxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **37**.

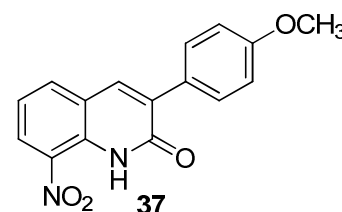
Formule brute :  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$

Apparence : Poudre orange.

Point de fusion : 229 °C.

Masse Molaire : 296,28 g/mol.

HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  297,0875, trouvée 297,0864.



La molécule **37** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (95/5), isolée et recristallisée dans l'acétonitrile sous forme de poudre orange avec un rendement de 88% (0,97 mmol 287 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,87 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 6,99-7,02 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,29-7,33 (m, 1 H, H6) ; 7,73-7,77 (m, 2H, H2' et H6') ; 7,87 (s, 1 H, H4) ; 7,91 (dd,  $J=7,6$  et  $1,6$  Hz, 1 H, H5) ; 8,47 (dd,  $J=8,3$  et  $1,4$  Hz, 1 H, H7) ; 11,38 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 55,4 ( $\text{CH}_3$ ) ; 114,0 (2xCH) ; 121,3 (CH) ; 122,9 (C) ; 125,6 (C) ; 126,9 (CH) ; 130,0 (2xCH) ; 132,7 (C) ; 132,9 (C) ; 134,0 (C) ; 135,3 (CH) ; 135,4 (CH) ; 160,3 (C) ; 161,2 (C).

### Préparation de la 3-(4-hydroxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **38**

Formule brute :  $C_{15}H_{10}N_2O_4$

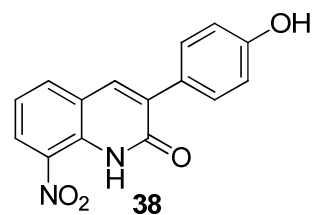
Apparence : Poudre orange.

Point de fusion : 266 °C.

Masse Molaire : 282,25 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{15}H_{11}N_2O_4$   $[M+H]^+$  283,0719, trouvée 283,0706.

La molécule **38** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (75/25) et isolé sous forme de poudre orange avec un rendement de 37% (0,41 mmol, 115 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6,84-6,88 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,40-7,44 (m, 1 H, H6) ; 7,67-7,71 (m, 2 H, H2' et H6') ; 8,20 (dd,  $J=7,7$  et 1,3 Hz, 1 H, H5) ; 8,26 (s, 1 H, H4) ; 8,40 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 9,74 (s, 1 H, OH) ; 11,12 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 115,4 (2xCH) ; 122,0 (CH) ; 122,8 (C) ; 125,8 (C) ; 127,1 (CH) ; 130,4 (2xCH) ; 132,3 (C) ; 132,5 (C) ; 133,5 (C) ; 136,0 (CH) ; 136,1 (CH) ; 158,5 (C) ; 160,8 (C).



### Préparation de la 3-(4-aminophényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **39**

Formule brute :  $C_{15}H_{11}N_3O_3$

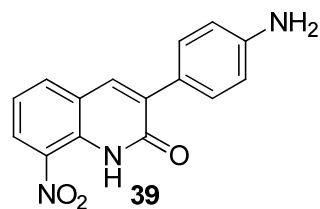
Apparence : Poudre orange.

Point de fusion : 280 °C.

Masse Molaire : 281,27 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{15}H_{12}N_3O_3$   $[M+H]^+$  282,0879, trouvée 282,0874.

La molécule **39** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (95/5) et isolé sous forme de poudre orange avec un rendement de 41% (0,45 mmol, 128 mg) RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 5,44 (s, 2 H,  $NH_2$ ) ; 6,61-6,65 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,37-7,41 (m, 1 H, H6) ; 7,58-7,62 (m, 2 H, H2' et H6') ; 8,15-8,18 (m, 2 H, H4 et H5) ; 8,36 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,07 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 113,6 (2xCH) ; 121,9 (CH) ; 122,1 (C) ; 123,1 (C) ; 126,5 (C) ; 129,9 (2xCH) ; 131,9 (C) ; 132,9 (C) ; 133,4 (C) ; 134,1 (CH) ; 135,8 (CH) ; 150,0 (CH) ; 161,0 (C).



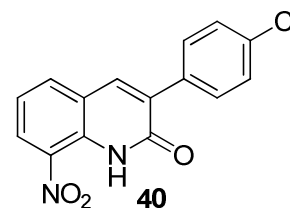
### Préparation de la 3-(4-chlorophényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **40**

Formule brute :  $C_{15}H_9N_2O_3Cl$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 222 °C.

Masse Molaire : 300,70 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{15}H_{10}ClN_2O_3$   $[M+H]^+$  301,0380, trouvée 301,0373.

La molécule **40** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (97/3) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 73% (0,80 mmol, 241 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,33-7,37 (m, 1 H, H6) ; 7,40-7,42 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,66-7,75 (m, 2 H, H2' et H6') ; 7,92 (s, 1 H, H4) ; 7,95 (dd, 1 H,  $J=7,6$  et 1,5 Hz, H5) ; 8,51 (dd, 1 H,  $J=8,4$  et 1,5 Hz, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 121,6 (CH) ; 122,4 (C) ; 126,9 (CH) ; 127,7 (CH) ; 128,7 (CH) ; 129,1 (CH) ; 129,7 (CH) ; 132,8 (C) ; 133,1 (C) ; 133,2 (C) ; 134,4 (C) ; 135,7 (CH) ; 136,2 (C) ; 137,3 (CH) ; 160,6 (C).

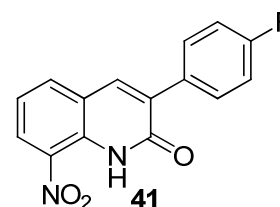
### Préparation de la 3-(4-fluorophényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **41**

Formule brute :  $C_{15}H_9N_2O_3F$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 217 °C.

Masse Molaire : 284,25 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{15}H_{10}FN_2O_3$   $[M+H]^+$  285,0675, trouvée 285,0676.

La molécule **41** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (98/2) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 70% (0,77 mmol, 219 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,12-7,20 (m, 2 H, H2' et H6') ; 7,31-7,36 (m, 1 H, H6) ; 7,73-7,80 (m, 2 H, H3' et H5'), 7,89 (s, 1 H, H4) ; 7,94 (dd,  $J=7,6$  et 1,5 Hz, 1 H, H5) ; 8,50 (dd,  $J=8,4$  et 1,5 Hz, 1 H, H7) ; 11,41 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 115,5 (d,  $J=21,6$  Hz, 2xCH) ; 121,5 (CH) ; 122,6 (C) ; 124,4 (C) ; 127,4 (CH) ; 130,6 (d,  $J=8,2$  Hz, 2xCH) ; 132,7 (C) ; 133,1 (C) ; 133,5 (C) ; 135,5 (CH) ; 136,5 (CH) ; 160,9 (C) ; 163,2 (d,  $J=249,2$  Hz, C).

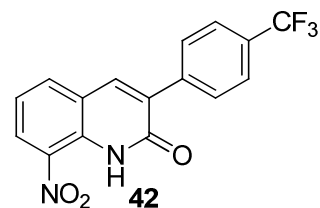
### Préparation de la 8-nitro-3-(4-trifluorométhylphényl)quinoléin-2(1H)-one **42**

Formule brute :  $C_{16}H_9N_2O_3F_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 168 °C.

Masse Molaire : 334,25 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_9N_2O_3F_3$   $[M+H]^+$  335,0644, trouvée 335,0629.

La molécule **42** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (98/2) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 60% (0,66 mmol, 220 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,34-7,38 (m, 1 H, H6) ; 7,72-7,75 (m, 2 H, H2' et H6') ; 7,88 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,95-7,98 (m, 2 H, H4 et H5) ; 8,53 (dd,  $J=8,4$  et  $1,4$  Hz, 1 H, H7) ; 11,45 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 121,7 (CH) ; 122,4 (C) ; 124,0 (q,  $J=272,3$  Hz, C) ; 125,4 (q,  $J=3,7$  Hz, 2xCH) ; 127,9 (CH) ; 129,1 (2xCH) ; 130,9 (q,  $J=32,5$  Hz, C) ; 132,8 (C) ; 133,2 (C) ; 133,4 (C) ; 135,8 (CH) ; 137,6 (CH) ; 138,0 (C) ; 160,5 (C).

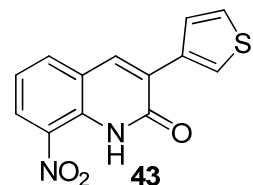
### Préparation de la 8-nitro-3-(3-thiophène)-quinoléin-2(1H)-one **43**

Formule brute :  $C_{13}H_9N_2O_3S$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 199 °C.

Masse Molaire : 272,28 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{13}H_9N_2O_3S$   $[M+H]^+$  273,0334, trouvée 273,0330.

La molécule **43** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (98/2) et isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 92% (1,01 mmol, 275 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,31-7,35 (m, 1 H, H6) ; 7,41-7,43 (m, 1 H, H4') ; 7,59 (dd, 1 H,  $J=5,1$  Hz et  $1,3$  Hz, H5') ; 7,94 (dd, 1 H,  $J=7,7$  Hz et  $1,4$  Hz, H5) ; 8,05 (s, 1 H, H4) ; 8,39 (dd, 1 H,  $J=3,0$  et  $1,3$  Hz, H2') ; 8,48 (dd, 1 H,  $J=8,4$  et  $1,4$  Hz, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 121,4 (CH) ; 122,6 (C) ; 123,6 (C) ; 125,6 (CH) ; 126,2 (CH) ; 127,0 (CH) ; 127,1 (CH) ; 128,6 (C) ; 132,4 (C) ; 134,1 (CH) ; 134,3 (C) ; 135,4 (CH) ; 160,6 (C).

### Préparation de la 3-(2-furanyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one **44**

Formule brute :  $C_{13}H_8N_2O_4$

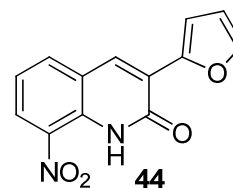
Apparence : Poudre rouge sombre.

Point de fusion : 257 °C.

Masse Molaire : 256,22 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{13}H_9N_2O_4$   $[M+H]^+$  257,0562, trouvée 257,0558.

La molécule **44** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane et isolée sous forme de poudre rouge sombre avec un rendement de 65% (0,71 mmol, 183 mg). RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6,58 (dd,  $J$ = 3,3 Hz et 1,9 Hz, 1 H, H4') ; 7,30-7,35 (m, 1 H, H6) ; 7,55-7,56 (m, 2 H, H3' et H5') ; 7,96 (dd,  $J$ = 7,6 et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,23 (s, 1 H, H4) ; 8,46 (dd,  $J$ = 8,3 et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 112,6 (CH) ; 114,2 (CH) ; 121,6 (CH) ; 122,5 (C) ; 123,6 (C) ; 126,9 (CH) ; 130,7 (CH) ; 132,0 (C) ; 132,8 (C) ; 135,5 (CH) ; 143,3 (CH) ; 147,7 (C) ; 158,7 (C).



### Préparation de la 8-nitro-3-(3-pyridinyl)-quinoléin-2(1H)-one **45**

Formule brute :  $C_{14}H_9N_3O_3$

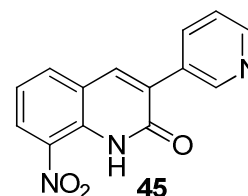
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 237 °C.

Masse Molaire : 267,24 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{14}H_{10}N_3O_3$   $[M+H]^+$  268,0722, trouvée 268,0712.

La molécule **45** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 62% (0,68 mmol, 182 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,35-7,39 (m, 1 H, H6) ; 7,40-7,43 (m, 1 H, H5') ; 7,97-7,99 (m, 2 H, H4 et H5) ; 8,20-8,23 (m, 1 H, H6') ; 8,53 (dd,  $J$ =8,4 et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 8,66 (dd,  $J$ =4,9 et 1,7 Hz, 1 H, H4') ; 8,90 (dd,  $J$ =2,3 et 0,9 Hz, 1 H, H2') ; 11,45 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 121,7 (CH) ; 122,3 (C) ; 123,1 (CH) ; 127,9 (CH) ; 130,5 (C) ; 131,4 (C) ; 132,8 (C) ; 133,3 (C) ; 135,8 (CH) ; 136,4 (CH) ; 137,2 (CH) ; 149,0 (CH) ; 150,0 (CH) ; 160,6 (C).



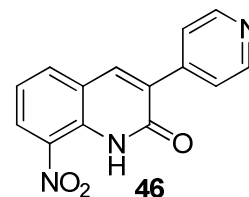
### Préparation de la 8-nitro-3-(4-pyridinyl)quinoléin-2(1H)-one **46**

Formule brute :  $C_{14}H_9N_3O_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 297 °C.

Masse Molaire : 267,24 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{14}H_{10}N_3O_3$   $[M+H]^+$  268,0722, trouvée 268,0713.

La molécule **46** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétone (80/20) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 71% (0,78 mmol, 209 mg), RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,36-7,40 (m, 1 H, H6) ; 7,70-7,72 (m, 2 H, H2' et H6') ; 7,98 (dd,  $J=7,9$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,03 (s, 1 H, H4) ; 8,55 (dd,  $J=8,4$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 8,73-8,74 (m, 2 H, H3' et H5') ; 11,46 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (TFA- $d$ , 100 MHz)  $\delta$ : 121,6 (C) ; 123,7 (CH) ; 126,1 (C) ; 126,7 (2xCH) ; 130,7 (CH) ; 132,4 (C) ; 133,4 (C) ; 137,5 (CH) ; 140,6 (2xCH) ; 144,1 (CH) ; 153,5 (C) ; 161,1 (C).

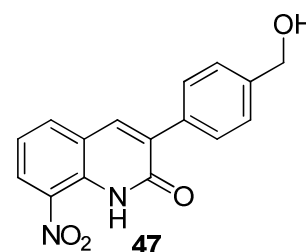
### Préparation de la 3-(4-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **47**

Formule brute :  $C_{16}H_{12}N_2O_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 219 °C.

Masse Molaire : 296,28 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{13}N_2O_4$   $[M+H]^+$  297,0875, trouvée 297,0878.

La molécule **47** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétone (75/25) et isolée sous la forme de poudre jaune avec un rendement de 77% (0,85 mmol, 251 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4,56 (d,  $J=5,6$ , 2 H,  $CH_2$ ) ; 5,26 (t,  $J=5,7$  Hz, 1 H, OH) ; 7,41-7,46 (m, 3 H, H6, H3' et H5') ; 7,76-7,79 (m, 2 H, H2' et H6') ; 8,23 (dd,  $J=7,6$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,36 (s, 1 H, H4) ; 8,43 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,17 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 63,1 ( $CH_2$ ) ; 122,1 (CH) ; 122,6 (C) ; 126,6 (2xCH) ; 127,6 (CH) ; 128,8 (2xCH) ; 132,6 (C) ; 132,7 (C) ; 133,6 (C) ; 134,0 (C) ; 136,4 (CH) ; 137,6 (CH) ; 143,6 (C) ; 160,8 (C).

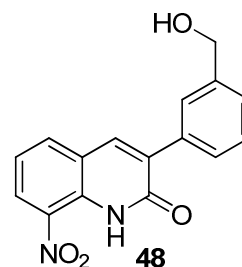
### Préparation de la 3-(3-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **48**

Formule brute :  $C_{16}H_{12}N_2O_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 155 °C.

Masse Molaire : 296,28 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{13}N_2O_4$   $[M+H]^+$  297,0875, trouvée 297,0861.

La molécule **48** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétone (75/25) et isolée sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 82% (0,90 mmol, 267 mg). RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4,58 (d,  $J=5,6$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ) ; 5,27 (t,  $J= 5,6$  Hz, 1 H, OH) ; 7,37-7,47 (m, 3 H, H6, H4' et H5') ; 7,66-7,68 (m, 1 H, H6') ; 7,73-7,75 (m, 1 H, H2') ; 8,25 (dd,  $J=7,8$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,35 (s, 1 H, H4) ; 8,44 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,17 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 63,3 ( $CH_2$ ) ; 122,1 (CH) ; 122,6 (C) ; 127,1 (CH) ; 127,2 (CH) ; 127,5 (CH) ; 127,7 (CH) ; 128,4 (CH) ; 132,7 (C) ; 133,0 (C) ; 133,7 (C) ; 135,1 (C) ; 136,5 (CH) ; 138,0 (CH) ; 142,9 (C) ; 160,6 (C).

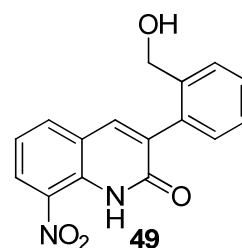
### Préparation de la 3-(2-hydroxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **49**

Formule brute :  $C_{16}H_{12}N_2O_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 208 °C.

Masse Molaire : 296,28 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{13}N_2O_4$   $[M+H]^+$  297,0875, trouvée 279,0869.

La molécule **49** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50) et isolée sous la forme de poudre jaune avec un rendement de 72% (0,79 mmol, 235 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 4,44 (d,  $J= 5,5$  Hz, 2 H,  $CH_2$ ) ; 5,09 (sl, 1H, OH) ; 7,28 (dd,  $J= 7,5$  et 1,4 Hz, 1 H, H3') ; 7,33-7,37 (m, 1 H, H6) ; 7,42-7,46 (m, 2 H, H4' et H5') ; 7,57 (dd,  $J=7,5$  et 1,4 Hz, 1 H, H6') ; 8,12 (s, 1 H, H4) ; 8,19 ( dd,  $J= 7,6$  Hz et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,45 (dd,  $J= 8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,19 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 63,7 ( $CH_2$ ) ; 121,9



(CH) ; 122,5 (C) ; 127,8 (CH) ; 128,4 (CH) ; 129,8 (CH) ; 130,1 (CH) ; 130,6 (CH) ; 132,7 (C) ; 133,1 (C) ; 133,9 (C) ; 135,7 (CH) ; 135,8 (C) ; 139,2 (CH) ; 139,9 (C) ; 162,2 (C).

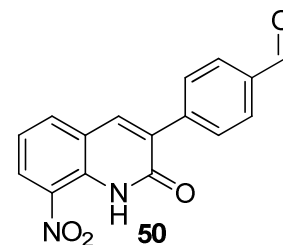
### Préparation de la 3-(4-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **50**

Formule brute :  $C_{16}H_{10}N_2O_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 243 °C.

Masse Molaire : 294,27 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{11}N_2O_4$   $[M+H]^+$  295,0719, trouvée 295,0710.

La molécule **50** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/cyclohexane (80/20), isolée et recristallisée sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 51% (0,56 mmol, 165 mg). RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,34-7,39 (m, 1 H, H6) ; 7,93-8,00 (m, 6 H, H4, H5, H2', H3', H5' et H6') ; 8,53 (dd,  $J$ = 8,5 Hz et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 10,08 (s, 1 H, CHO) ; 11,45 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 121,7 (CH) ; 122,3 (C) ; 128,0 (CH) ; 129,4 (2xCH) ; 129,8 (2xCH) ; 132,8 (C) ; 133,2 (C) ; 133,4 (C) ; 135,9 (CH) ; 136,4 (C) ; 137,9 (CH) ; 140,5 (C) ; 160,5 (C) ; 191,7 (CH).

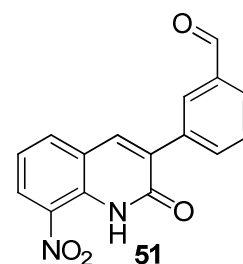
### Préparation de la 3-(3-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **51**

Formule brute :  $C_{16}H_{10}N_2O_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 209 °C.

Masse Molaire : 294,27 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{11}N_2O_4$   $[M+H]^+$  295,0719, trouvée 295,0713.

La molécule **51** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétone (75/25) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 32% (0,35 mmol, 104 mg). RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,34-7,39 (m, 1 H, H6) ; 7,63-7,69 (m, 1 H, H5') ; 7,94-7,99 (m, 2 H, H5 et H6') ; 8,01 (s, 1 H, H4) ; 8,10-8,13 (m, 1 H, H4') ; 8,25-8,26 (m, 1 H, H2') ; 8,53

(dd,  $J = 8,4$  et  $1,4$  Hz, 1 H, H7) ; 10,10 (s, 1 H, CHO) ; 11,5 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 121,7 (CH) ; 122,4 (C) ; 127,8 (CH) ; 129,2 (CH) ; 129,7 (CH) ; 130,2 (CH) ; 132,8 (C) ; 133,1 (C) ; 133,3 (C) ; 134,7 (CH) ; 135,6 (C) ; 135,8 (CH) ; 136,6 (C) ; 137,5 (CH) ; 160,7 (C) ; 192,0 (CH).

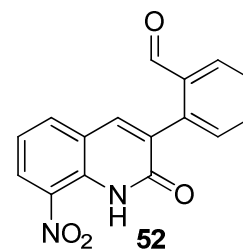
### Préparation de la 3-(2-formylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **52**

Formule brute :  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 230-231 °C.

Masse Molaire : 294,27 g/mol.



HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  295.0719, trouvée 295.0718.

La molécule **52** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (60/40) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 65% (0,71 mmol, 210 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,35-7,37 (m, 1 H, H6) ; 7,44 (dd,  $J = 7,5$  Hz et  $1,3$  Hz, 1 H, H6') ; 7,61-7,65 (m, 1 H, H4') ; 7,68-7,72 (m, 1 H, H5') ; 7,82 (s, 1 H, H4) ; 7,93 (dd,  $J = 7,6$  Hz et  $1,4$  Hz, 1 H, H3') ; 7,99 (dd,  $J = 7,8$  Hz et  $1,4$  Hz, 1 H, H5) ; 8,53 (dd,  $J = 8,4$  Hz et  $1,4$  Hz, 1 H, H7) ; 10,03 (s, 1 H, CHO) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 121,6 (CH) ; 122,3 (C) ; 127,8 (CH) ; 129,5 (CH) ; 130,8 (CH) ; 131,0 (CH) ; 133,0 (C) ; 133,7 (C) ; 133,9 (CH) ; 134,5 (C) ; 135,0 (C) ; 135,7 (CH) ; 136,1 (C) ; 138,0 (CH) ; 160,8 (C) ; 191,2 (CH).

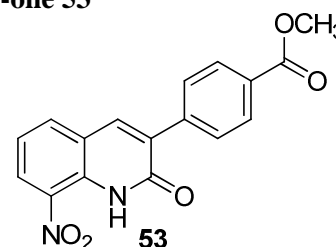
### Préparation de la 3-(4-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **53**

Formule brute :  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 245 °C.

Masse Molaire : 324,29 g/mol.



HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  325.0824, trouvée 325.0818.

La molécule **53** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane, isolée et recristallisée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 72% (0,79

mmol, 257 mg), RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,95 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 7,33-7,38 (m, 1 H, H6) ; 7,84-7,87 (m, 2 H, H2' et H6') ; 7,95-7,97 (m, 2 H, H4 et H5) ; 8,12-8,15 (m, 2 H, H3' et H5') ; 8,52 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,43 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 52,3 ( $\text{CH}_3$ ) ; 121,6 (CH) ; 122,4 (C) ; 127,8 (CH) ; 128,7 (2xCH) ; 129,7 (2xCH) ; 130,4 (C) ; 132,8 (C) ; 133,3 (C) ; 133,5 (C) ; 135,8 (CH) ; 137,6 (CH) ; 139,0 (C) ; 160,6 (C) ; 166,7 (C).

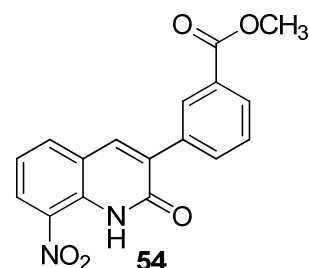
### Préparation de la 3-(3-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **54**

Formule brute :  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 212 °C.

Masse Molaire : 324,29 g/mol.



HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  325,0824, trouvée 325,0809.

La molécule **54** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/cyclohexane (90/10) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 71% (0,78 mmol, 253 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,95 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 7,33-7,37 (m, 1 H, H6) ; 7,53-7,58 (m, 1 H, H5') ; 7,96 (dd,  $J=7,7$  Hz et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 7,98 (s, 1 H, H4) ; 8,05-8,11 (m, 2 H, H4' et H6') ; 8,36-8,37 (m, 1 H, H2') ; 8,51 (dd,  $J=8,4$  Hz et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 52,3 ( $\text{CH}_3$ ) ; 121,6 (CH) ; 122,5 (C) ; 127,7 (CH) ; 128,6 (CH) ; 129,6 (CH) ; 130,0 (CH) ; 130,5 (C) ; 132,8 (C) ; 133,2 (C) ; 133,4 (CH) ; 133,5 (C) ; 134,8 (C) ; 135,7 (CH) ; 137,3 (CH) ; 160,7 (C) ; 166,7 (C).

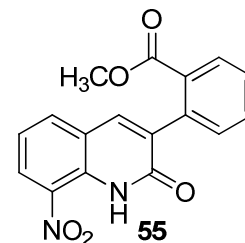
### Préparation de la 3-(2-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **55**

Formule brute :  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 212 °C.

Masse Molaire : 324,29 g/mol.



HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  325,0824, trouvée 325,0819.

La molécule **55** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange cyclohexane/acétone (70/30) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 72% (0,79 mmol, 257 mg). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,82 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ) ; 7,29-7,33 (m, 1 H, H6) ; 7,37-7,39 (m, 1 H, H6') ; 7,49-7,53 (m, 1 H, H4') ; 7,60-7,64 (m, 1 H, H5') ; 7,77 (s, 1 H, H4) ; 7,91 (d,  $J=7,65$  Hz, 1 H, H3') ; 8,02 (d,  $J=7,8$  Hz, 1 H, H5) ; 8,48 (d,  $J=8,4$  Hz, 1 H, H7) ; 11,34 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 52,3 ( $\text{CH}_3$ ) ; 121,4 (CH) ; 122,7 (C) ; 127,2 (CH) ; 129,0 (CH) ; 130,1 (CH) ; 130,6 (CH) ; 131,0 (C) ; 132,4 (CH) ; 132,9 (C) ; 133,4 (C) ; 135,5 (CH) ; 135,6 (CH) ; 135,8 (C) ; 137,0 (C) ; 160,9 (C) ; 167,5 (C).

### Procédure générale pour la préparation des composés 56-58

Dans un ballon de 100 mL, 40 mL d'un mélange  $\text{H}_2\text{O}$ /Ethanol (20/80) ont été ajoutés sur 200 mg de la 3-(méthoxycarbonylphényl)-nitroquinoléin-2(1H)-one correspondante (0,62 mmol, 1 équiv.). Par la suite, 124 mg de NaOH (3,1 équiv., 5 équiv.) ont alors été ajoutés et le milieu réactionnel a été ajouté à 60°C pendant 3 h. Le mélange réactionnel a alors été successivement versé dans un bécher d'eau, neutralisé par une solution de HCl à 37%, extrait deux fois au dichlorométhane (2 fois 25 mL) et deux fois à l'acétate d'éthyle (2 fois 25 mL). Les phases organiques résultantes ont été lavées avec de l'eau à pH=1, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporées sous pression réduite. Les bruts réactionnels ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un éluant adapté et recristallisés si nécessaire pour donner les composés **55-57**.

### Préparation de la 3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **56**

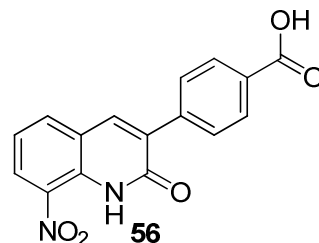
Formule brute :  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion > 310  C.

Masse Molaire : 310,26 g/mol.

HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  311,0668, trouvée 311,0669.



La molécule **56** a été lavée avec de l'eau à pH basique, isolée et recristallisée dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec un rendement de 65% (0,40 mmol, 124 mg). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7,45-7,49 (m, 1 H, H<sub>6</sub>) ; 7,93-7,96 (m, 2 H, H<sub>2</sub>' et H<sub>6</sub>') ; 8,03-8,06 (m, 2 H, H<sub>3</sub>' et H<sub>5</sub>') ; 8,26 (dd, J= 7,9 et 1,4 Hz, 1 H, H<sub>5</sub>) ; 8,46 (dd, J=8,3 et 1,4 Hz, 1 H, H<sub>7</sub>) ; 8,49 (s, 1 H, H<sub>4</sub>) ; 11,23 (sl, 1 H, NH) ; 13,07 (sl, 1 H, COOH) . RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 122,3 (CH) ; 122,35 (C) ; 128,1 (CH) ; 129,2 (2xCH) ; 129,6 (2xCH) ; 131,0 (C) ; 131,7 (C) ; 132,8 (C) ; 133,8 (C) ; 136,7 (CH) ; 139,1 (CH) ; 139,5 (C) ; 160,4 (C) ; 167,5 (C).

### Préparation de la 3-(3-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **57**

Formule brute : C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

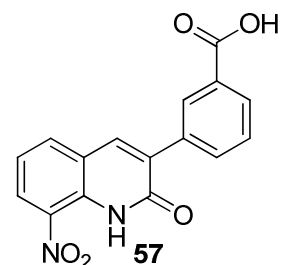
Apparence : Poudre marron.

Tdec : 305-306 °C.

Masse Molaire : 310,26 g/mol.

HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 311.0668, trouvée 311.0672.

La molécule **57** a été lavée avec de l'eau à pH basique et isolée sous forme de poudre marron avec un rendement de 42% (0,28 mmol, 88 mg). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,44-7,48 (m, 1 H, H<sub>6</sub>) ; 7,60-7,64 (m, 1 H, H<sub>5</sub>') ; 8,00-8,02 (m, 1 H, H<sub>6</sub>') ; 8,03-8,06 (m, 1 H, H<sub>4</sub>') ; 8,27 (dd, 1 H, J=7,8 et 1,4 Hz, H<sub>5</sub>) ; 8,39-8,40 (m, 1 H, H<sub>2</sub>') ; 8,46 (dd, 1 H, J=8,3 et 1,4 Hz, H<sub>7</sub>) ; 8,47 (s, 1 H, H<sub>4</sub>) ; 11,22 (sl, 1 H, NH) ; 13,05 (sl, 1 H, COOH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 122,2 (CH) ; 122,5 (C) ; 127,9 (CH) ; 129,0 (CH) ; 129,8 (CH) ; 129,9 (CH) ; 131,3 (C) ; 131,8 (C) ; 132,8 (C) ; 133,4 (CH) ; 133,7 (C) ; 135,6 (C) ; 136,7 (CH) ; 138,6 (CH) ; 160,5 (C) ; 167,6 (C).



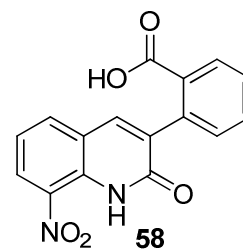
### Préparation de la 3-(2-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **58**

Formule brute :  $C_{16}H_{10}N_2O_5$

Apparence : Poudre jaune.

Tdec : 282-285 °C.

Masse Molaire : 310,26 g/mol.



HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{16}H_{11}N_2O_5$   $[M+H]^+$  311.0668, trouvée 311.0673.

La molécule **58** a été purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (50/50) et isolée sous forme de poudre jaune avec un rendement de 57% (0,35 mmol, 109 mg). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7,43-7,48 (m, 2 H, H6 et H6') ; 7,54-7,58 (m, 1 H, H4') ; 7,66-7,70 (m, 1 H, H5') ; 7,91 (dd,  $J=7,7$  et 1,4 Hz, 1 H, H5) ; 8,13 (s, 1 H, H4) ; 8,20 (dd,  $J=7,8$  et 1,4 Hz, 1 H, H3') ; 8,42 (dd,  $J=8,3$  et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 11,08 (sl, 1 H, NH) ; 12,72 (sl, 1 H, COOH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 122,1 (CH) ; 122,6 (C) ; 127,4 (CH) ; 129,1 (CH) ; 129,8 (CH) ; 131,3 (CH) ; 132,4 (CH) ; 132,5 (C) ; 132,7 (C) ; 133,9 (C) ; 136,1 (CH) ; 136,2 (C) ; 136,3 (CH) ; 136,4 (C) ; 160,7 (C) ; 168,43 (C).

### Préparation de la 3-(4-carboxyphényl)-2-méthoxy-8-nitroquinoléine **59**

Dans une première étape, sous atmosphère inerte (Argon), 260 mg de 3-(4-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **52** (0,80 mmol, 1 équiv.) ont été solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre et ont été ajoutés à une solution de 5 mL de DMF anhydre contenant 64 mg d'hydruure de sodium à 60% (1,6 mmol, 2 équiv.). Après 10 min d'agitation à t.a., 100  $\mu$ L d'iodure de méthyle (1,6 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 24 h, avant d'être versé dans un bain de glace. Le précipité obtenu a ensuite été filtré et séché sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **59** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 76% (0,61 mmol, 206 mg). Dans une seconde étape, 40 mL d'un mélange  $H_2O$ /Ethanol (20/80) ont été ajoutés sur 150 mg de 2-méthoxy-3-(4-méthoxycarbonylphényl)-8-nitroquinoléine (0,44 mmol, 1 équiv.). Par la suite, 88 mg de NaOH (2,2 mmol, 5 équiv.) ont été ajoutés et le milieu réactionnel a été chauffé à 60

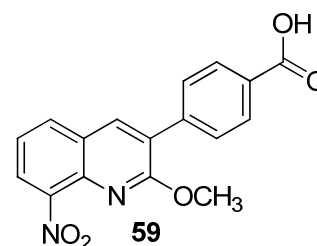
°C pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été successivement versé dans un bécher d'eau, neutralisé avec du HCl à 37%, extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 50 mL) et deux fois à l'acétate d'éthyle (2 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporé sous pression réduite. Le composé **59** a été lavé avec de l'eau à pH basique et isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 61% (0,27 mmol, 87 mg)

Formule brute : C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Apparence : Poudre blanche.

Tdec: 270-274 °C.

Masse Molaire : 324,29 g/mol.



HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 325,0824, trouvée 325,0822.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 4,00 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 7,61-7,65 (m, 1 H, H<sub>6</sub>) ; 7,80-7,82 (m, 2 H, H<sub>2</sub>' et H<sub>6</sub>') ; 8,05-8,07 (m, 2 H, H<sub>3</sub>' et H<sub>5</sub>') ; 8,23 (dd, J=7,8 et 1,4 Hz, 1 H, H<sub>5</sub>) ; 8,27 (dd, J=8,1 et 1,4 Hz, 1 H, H<sub>7</sub>) ; 8,56 (s, 1 H, H<sub>4</sub>) ; 13,07 (sl, 1 H, COOH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 54,5 (CH<sub>3</sub>) ; 124,1 (CH) ; 124,7 (C) ; 126,6 (CH) ; 127,0 (C) ; 129,7 (2xCH) ; 130,0 (2xCH) ; 130,9 (C) ; 132,7 (CH) ; 136,7 (C) ; 139,3 (CH) ; 140,0 (C) ; 146,2 (C) ; 160,8 (C) ; 167,5 (C).

### Préparation de la 8-nitro-3-phényléthynylquinoléin-2(1H)-one **60**

Dans un tube scellé de 10 mL, 100 mg de 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** (0,37 mmol, 1 équiv.), 7 mg de CuI (0,037 mmol, 0,1 équiv.) et 43 mg de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,037 mmol, 0,1 équiv.) ont été ajoutés. Sous atmosphère inerte (Argon), 5 mL de diméthoxyéthane anhydre, 155 µL de Et<sub>3</sub>N (1,11 mmol, 3 équiv.), 61 µL de phénylacétylène (0,56 mmol, 1,5 équiv.) ont successivement été ajoutés. Le milieu réactionnel a été maintenant à 15°C pendant 1.5 h. Le mélange réactionnel a alors été versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane et le composé **60** a été isolé sous forme de poudre grise avec un rendement de 72% (0,27 mmol, 78 mg).



Formule brute :  $C_{17}H_{10}N_2O_3$

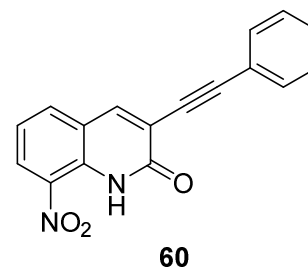
Apparence : Poudre grise.

Point de fusion : 186-187 °C.

Masse Molaire : 290,28 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{17}H_{13}N_2O_5 [M+H]^+$  291,0770, trouvée 291,0776.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,31-7,35 (m, 1H, H6) ; 7,37-7,38 (m, 2H, H3', H4' et H5') ; 7,59-7,63 (m, 2H, H2' et H6') ; 7,87 (dd, J= 7,6 et 1,5 Hz, 1H, H5) ; 8,06 (s, 1H, H4) ; 8,49 (dd, J= 8,4 et 1,4 Hz, 1H, H7) ; 11,40 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 83,4 (C) ; 97,3 (C) ; 119,6 (C) ; 121,8 (CH) ; 122,0 (C) ; 122,1 (C) ; 128,0 (CH) ; 128,4 (2xCH) ; 129,2 (CH) ; 132,1 (2xCH) ; 133,0 (C) ; 133,0 (C) ; 135,3 (CH) ; 141,6 (C) ; 159,9 (C).



### Préparation de la 8-nitro-2-phenylfuro[2,3-b]quinoline **61**

Dans un tube scellé de 10 mL, 100 mg de 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** (0,37 mmol, 1 équiv.), 7 mg de CuI (0,037 mmol, 0,1 équiv.) et 43 mg de  $Pd(PPh_3)_4$  (0,037 mmol, 0,1 équiv.) ont été ajoutés. Sous atmosphère inerte (Argon), 5 mL de diméthoxyéthane anhydre, 155  $\mu L$  de  $Et_3N$  (1,11 mmol, 3 équiv.), 61  $\mu L$  de phénylacétylène (0,56 mmol, 1,5 équiv.) ont été successivement ajoutés. Le milieu réactionnel a été chauffé à 40°C pendant 30 min puis a été versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois au dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane et le composé **61** a été isolé sous forme de poudre grise avec un rendement de 51% (0,19 mmol, 55 mg).

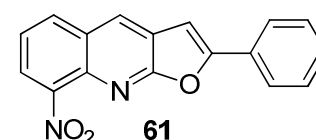
Formule brute :  $C_{17}H_{10}N_2O_3$

Apparence : Poudre grise.

Point de fusion : 226 °C.

Masse Molaire : 290,28 g/mol.

HRMS (DCI- $CH_4$ ) calculée pour  $C_{17}H_{11}N_2O_3 [M+H]^+$  291,0770, trouvée 291,0768.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,16 (s, 1H, H3) ; 7,45-7,55 (m, 3H, H3', H4' et H5') ; 7,56-7,59 (m, 1H, H6) ; 7,99-8,02 (m, 2H, H2' et H6') ; 8,08 (dd,  $J = 7,5$  et  $1,4$  Hz, 1H, H5) ; 8,14 (dd,  $J = 8,3$  et  $1,4$  Hz, 1H, H7) ; 8,41 (s, 1H, H4). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 99,2 (C) ; 123,3 (CH) ; 123,4 (CH) ; 124,0 (C) ; 125,9 (2xCH) ; 127,7 (C) ; 128,2 (CH) ; 128,6 (C) ; 129,1 (2xCH) ; 130,5 (CH) ; 132,0 (CH) ; 136,0 (C) ; 147,7 (C) ; 159,6 (C) ; 162,4 (C).

### 3. Partie Biologie

#### Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de *Leishmania infantum*.<sup>364</sup>

Des promastigotes de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Montpellier Leishmania, France, exprimant la luciférase) en phase logarithmique, cultivés dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100  $\mu\text{g/mL}$  de streptomycine), ont été centrifugés à 900g pendant 10 minutes. La surnageant a été enlevé avec attention et a été remplacé avec le même volume de milieu RPMI 1640 ajusté à pH = 5,4 et incubé pendant 24 h à 24 °C. Les promastigotes acidifiés ont ensuite été incubés à 24 h à 37 °C dans une flasque ventilée. Les promastigotes ont ainsi été transformés en amastigotes axéniques. L'effet des molécules testées sur la croissance des amastigotes axéniques de *L. infantum* a été évalué comme suit. Les amastigotes ont été incubés à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans des plaques 96 puits avec diverses concentrations de produits solubilisés dans du DMSO-D6 (concentration finale inférieure à 0,5%) en duplicata. Les contrôles DMSO-D6, amphotéricine B, miltéfosine et fexinidazole (les médicaments de références ont été achetées à Sigma-Aldrich) ont été ajoutés lors de chaque expérience. Après 48 h d'incubation à 37 °C, chaque plaque a été observée au microscope afin de détecter l'éventuelle présence de précipités. Pour estimer l'activité de la luciférase des amastigotes axéniques, 80  $\mu\text{L}$  de chaque puit a été transféré dans une plaque blanche de 96 puits, le réactif Steady Glow® (Promega) a été ajouté selon les recommandations du fabricant, et les plaques incubées pendant 2 minutes. La luminescence a été mesurée par le compteur de luminescence Microbeta (PerkinElmer). La concentration inhibitrice 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) a été définie comme la concentration de composé requise pour inhiber 50% de l'activité métabolique des amastigotes de *L. infantum* en comparaison avec le contrôle. Les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  ont été calculées via une analyse de régression non-linéaire traitées selon des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

<sup>364</sup> C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A. F. Alvarez *et al.* *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 143, 1635-1643.

### **Evaluation de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires HepG2.**

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules testées sur des cellules HepG2 (certifiées sans mycoplasmes, ref 85011430-1VL chez Sigma-Aldrich) a été réalisée selon la méthode de Mosman.<sup>350</sup> Des cellules (à une concentration de  $5 \times 10^4$ /mL) dans 100  $\mu$ L de milieu Alpha MEM Eagle supplémenté avec du 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100  $\mu$ g/mL stréptomycine) ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et incubées à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24 h d'incubation, 100  $\mu$ L de milieu avec diverses concentrations de produit et les contrôles appropriés ont été ajoutés et les plaques incubées pendant 72 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Chaque plaque a ensuite été examinée au microscope afin d'observer l'éventuelle formation de précipités avant que le milieu ne soit aspiré de ces puits. 100  $\mu$ L d'une solution de MTT à 0,5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puit et les cellules incubées pendant 2 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après ce temps, la solution de MTT a été aspirée de chaque puit et 100  $\mu$ L de DMSO-D6 a été ajouté dans chacun d'entre eux pour solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 570 nm sur un spectrophotomètre Eon BioTek. Le DMSO-D6 a été utilisé comme blanc et la doxorubicine comme contrôle positif. Les CC<sub>50</sub> ont été calculées par une analyse de régression non linéaire sur des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Elles représentent la valeur moyenne calculées depuis 3 expériences réalisées indépendamment.

---

<sup>350</sup> T. J. Mosman, *Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63

# Antitrypanosomatid Pharmacomodulation at Position 3 of the 8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one Scaffold Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions

Julien Pedron,<sup>+, [a]</sup> Clotilde Boudot,<sup>[b]</sup> Sandra Bourgeade-Delmas,<sup>[c]</sup> Alix Sournia-Saquet,<sup>[a]</sup> Lucie Paloque,<sup>[a]</sup> Maryam Rastegari,<sup>[a]</sup> Mansour Abdoulaye,<sup>[a]</sup> Hussein El-Kashef,<sup>[d]</sup> Colin Bonduelle,<sup>[a]</sup> Geneviève Pratviel,<sup>[a]</sup> Susan Wyllie,<sup>[e]</sup> Alan H. Fairlamb,<sup>[e]</sup> Bertrand Courtioux,<sup>[b]</sup> Pierre Verhaeghe,<sup>\*, [a]</sup> and Alexis Valentin<sup>[c]</sup>

An antikinetoplastid pharmacomodulation study at position 3 of the recently described hit molecule 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was conducted. Twenty-four derivatives were synthesised using the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction and evaluated in vitro on both *Leishmania infantum* axenic amastigotes and *Trypanosoma brucei brucei* trypomastigotes. Introduction of a *para*-carboxyphenyl group at position 3 of the scaffold led to the selective antitrypanosomal hit molecule 3-(4-carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (**21**) with a lower

reduction potential (−0.56 V) than the initial hit (−0.45 V). Compound **21** displays micromolar antitrypanosomal activity (IC<sub>50</sub> = 1.5 μM) and low cytotoxicity on the human HepG2 cell line (CC<sub>50</sub> = 120 μM), having a higher selectivity index (SI = 80) than the reference drug eflornithine. Contrary to results previously obtained in this series, hit compound **21** is inactive toward *L. infantum* and is not efficiently bioactivated by *T. brucei brucei* type I nitroreductase, which suggests the existence of an alternative mechanism of action.

## Introduction

Kinetoplastids are flagellated protozoan parasites responsible for lethal neglected tropical diseases such as human African trypanosomiasis (HAT) and visceral leishmaniasis (VL). They are characterised by the presence of a circular piece of DNA, called a kinetoplast, adjacent to the flagellar basal body. *Trypanosoma* parasites are transmitted by the bite of an infected sandfly and are the causative agents of HAT, also known as sleeping sickness. There are many species of *Trypanosoma*, but only *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense* are responsible for HAT.<sup>[1]</sup> During the process of infection, metacyclic trypomasti-

gotes enter the blood circulation from the bite of the tsetse fly and spread throughout the whole organism, where they differentiate into bloodstream trypomastigotes; this is the hemolymphatic stage. After several weeks or months of symptoms such as headaches, anaemia and hepatosplenomegaly, trypomastigotes cross the blood–brain barrier and cause damage to the central nervous system, leading to sleeping disorders, behavioural disorders, seizures, coma and finally death: this is the meningoencephalic stage.<sup>[2]</sup> *Leishmania*, which is responsible for leishmaniasis, is another protozoan parasite and is transmitted by the bite of an infected sandfly. *L. donovani* and *L. infantum* are the two major species causing the most severe form of the disease: VL.<sup>[3]</sup> In brief, metacyclic promastigotes penetrate the skin during the blood meal of an infected sandfly. They are internalised by mononuclear phagocytic cells such as macrophages, in which they differentiate into amastigotes. The parasites continue to multiply until the destruction of these cells and disseminate into many organs, such as liver and spleen, leading to death.<sup>[4]</sup>

It is estimated that more than 1 billion people are at risk of contracting HAT and VL and that each year there are 55 000 new cases with more than 25 000 deaths from these diseases.<sup>[5,6]</sup> These numbers are likely underestimated because of the difficulty in accessing rural areas and the unspecific symptoms in the early stages of the diseases. Currently, there are few efficient and safe drugs available on the market against these neglected tropical diseases. Pentamidine and suramin are used for the treatment of the first stage of HAT but these drugs are highly toxic and require the patient to be hospitalised for i.v.

[a] J. Pedron,<sup>+</sup> Dr. A. Sournia-Saquet, Dr. L. Paloque, M. Rastegari, M. Abdoulaye, Dr. C. Bonduelle, Dr. G. Pratviel, Prof. P. Verhaeghe LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse (France)  
E-mail: pierre.verhaeghe@lcc-toulouse.fr

[b] C. Boudot,<sup>+</sup> Dr. B. Courtioux  
Université de Limoges, UMR INSERM 1094, Neuroépidémiologie Tropicale, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges (France)

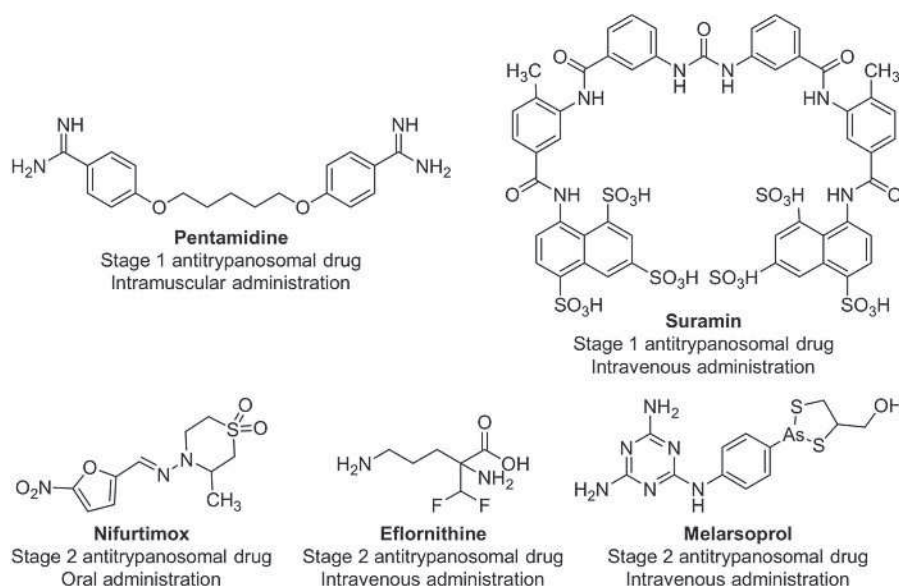
[c] Dr. S. Bourgeade-Delmas, Prof. A. Valentin  
UMR 152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 35 Chemin des Maraîchers, 31400 Toulouse (France)

[d] Prof. H. El-Kashef  
Assiut University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 71516 Assiut (Egypt)

[e] Dr. S. Wyllie, Prof. A. H. Fairlamb  
University of Dundee, School of Life Sciences, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery, Dow Street, Dundee DD1 5EH (UK)

[<sup>+</sup>] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800456>.



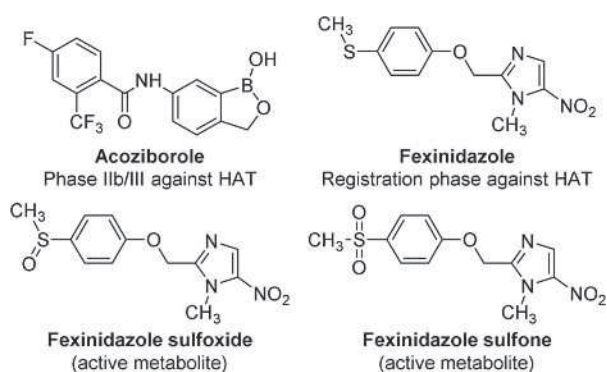
**Figure 1.** Structure, indication and route of administration of antitrypanosomal drugs on the market.

administration.<sup>[7]</sup> Melarsoprol, an arsenic-containing drug, and a combination of eflornithine and nifurtimox are suitable for the second stage of HAT (Figure 1).<sup>[8]</sup> The same is true of VL, for which only amphotericin B, miltefosine, antimonial derivatives, pentamidine and paromomycin are available. Among these drugs, miltefosine is the only orally available drug. These drugs are either expensive (e.g., liposomal amphotericin B), present severe side effects (e.g., the nephrotoxicity of amphotericin B, the teratogenicity of miltefosine) or show an increasing lack of efficacy due to the emergence of resistant parasites (antimony derivatives and miltefosine).<sup>[9]</sup> This global issue calls for the discovery of new antikinetoplastid molecules.

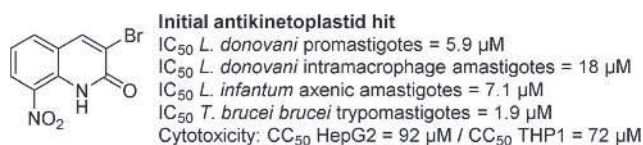
Unfortunately, today, there are only two new chemical entities in clinical trials against HAT and none against VL (Figure 2).<sup>[10]</sup> Acoziborole is an orally active benzoxaborole in phase IIb/III of clinical trials; it is active against both stages of HAT.<sup>[11]</sup> Fexinidazole, a 5-nitroimidazole, was recently in phase II of clinical trials against VL but showed a lack of efficacy, whereas it progressed to a phase IIIb study against HAT.<sup>[12,13]</sup> This molecule is rapidly metabolised in vivo into two metabolites (a

sulfoxide and a sulfone derivative) which are active against the *Trypanosoma* parasites. Fexinidazole is selectively bioactivated by type I parasitic nitroreductases (NTRs) leading, through a successive two-electron reduction, to cytotoxic electrophilic metabolites such as nitroso and hydroxylamine derivatives.<sup>[14]</sup> Two NTRs have been identified in *Leishmania* (NTR1 and NTR2)<sup>[15,16]</sup> and only one in *Trypanosoma*.<sup>[17]</sup> These nitroreductases are absent from mammalian cells. Therefore, substrates of these enzymes could be selective antikinetoplastid candidates. Unfortunately, no X-ray structure of these parasitic NTRs is available, which restricts the use of most classical rational medicinal chemistry approaches, such as docking, for the design of new substrates of these enzymes.

Our research team has been working on the synthesis of new antikinetoplastid molecules for several years. Starting from a chemical study on 2-substituted nitroquinoline derivatives with antiparasitic potential,<sup>[18]</sup> we identified a new antileishmanial hit: 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.<sup>[19]</sup> Pharmacomodulation studies at position 4 of this scaffold were then realised.<sup>[20,21]</sup> Recently, we described a comprehensive electrochemistry-guided study of this pharmacophore and the development of a computational model able to predict the redox potentials of each molecule in the series.<sup>[22]</sup> Thus, a new antikinetoplastid hit molecule was identified (Figure 3). This molecule was not genotoxic in a comet assay and was selectively bioactivated by type 1 NTRs of *L. donovani* and *T. brucei*.<sup>[22]</sup>



**Figure 2.** Molecular structure of drug candidates acoziborole and fexinidazole (with its active metabolites).



**Figure 3.** Structure and biological profile of the previously identified antikinetoplastid hit 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.

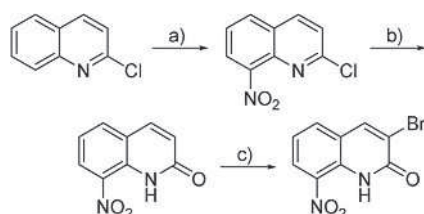


Here, we present a pharmacomodulation study at position 3 of the scaffold, using Suzuki–Miyaura or Sonogashira cross-coupling reactions. To explore structure–activity relationships, 26 molecules were synthesised and evaluated on both *L. infantum* axenic amastigotes and *T. brucei brucei* trypomastigotes. These molecules were also assessed for their cytotoxicity on the HepG2 human cell line.

## Results and Discussion

### Chemistry

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one was prepared in three steps, as presented in Scheme 1.<sup>[22]</sup> Nitration of 2-chloroquinoline mainly led to the intermediate 2-chloro-8-nitroquinoline, which was transformed in a second step into the corresponding lactam, according to a previously reported procedure.<sup>[23]</sup> 8-Nitroquinolin-2(1*H*)-one was finally selectively halogenated at



**Scheme 1.** Synthesis of the initial antikinetoplastid hit. a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , RT, 2 h, 50%; b)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{HClO}_4$ , 100 °C, 72 h, 96%; c)  $\text{NaBrO}_3$ ,  $\text{HBr}$  (48% in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 100 °C, 5 h, 68%.

position 3 by heating in  $\text{HBr}$  (48% aqueous solution) at reflux in the presence of sodium bromate, as reported by O'Brien and co-workers.<sup>[24]</sup>

Then, the microwave-assisted Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one and *p*-methoxyphenylboronic acid was studied to find optimal conditions (Table 1). Several parameters were investigated such as the nature of the solvent, base, Pd catalyst and the reaction temperature.

The first Suzuki–Miyaura reaction conditions (Table 1, entry 1) were inspired from a previously described protocol for introducing an aryl moiety at position 3 of the quinolinone ring.<sup>[25]</sup> This reaction was achieved in DMF with microwave (MW) heating, using 3 equivalents of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  as a base, 0.1 equivalents of  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  as a catalyst and 1.2 equivalents of *p*-methoxyphenylboronic acid in a sealed tube, to afford the desired compound in 43% yield. The first parameter studied was the solvent (Table 1, entries 1–7). By using toluene, dioxane, THF, 1,2-dimethoxyethane (DME) or DMSO, partial conversion or degradation of the substrate was observed, whereas the use of a DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  mixture led to a 46% yield. Then, two others bases were studied (Table 1, entries 8–9) but in each case led to the degradation of the substrate within 1 h. In DMF, the replacement of  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  with  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  decreased the yield of the reaction from 43% to 26% (Table 1, entry 10). Then, adapting another previously described protocol using DME and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (Table 1, entry 11), a slightly better yield was obtained.<sup>[26]</sup> This result was then improved by replacing  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  with  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , which afforded a yield of 84%. The nature of the

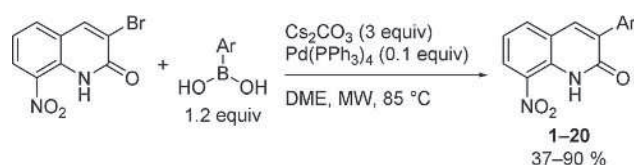
**Table 1.** Optimisation of the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one and *p*-methoxyphenylboronic acid.

Entry	Solvent	Base, 3 equiv	Catalyst	Temperature [°C]	Time [h]	Yield [%] <sup>[a]</sup>
1	DMF	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	150	1	43
2	DMSO	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	150	1	— <sup>[b]</sup>
3	Toluene	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	110	8	— <sup>[c]</sup>
4	Dioxane	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	100	8	— <sup>[c]</sup>
5	THF	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	66	8	— <sup>[c]</sup>
6	DME	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	85	8	— <sup>[c]</sup>
7	DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	100	1	46
8	DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	100	1	— <sup>[b]</sup>
9	DMF/ $\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	100	1	— <sup>[b]</sup>
10	DMF	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.1 equiv	150	1	26
11	DME	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.1 equiv	85	3	52
12	DME	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.1 equiv	85	4	84
13	DME	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_2)\text{Cl}_2$ , 0.1 equiv	85	8	— <sup>[c]</sup>
14	DME	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ , 0.1 equiv	85	8	— <sup>[c]</sup>
15	DME	$\text{K}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , 0.1 equiv	85	8	— <sup>[c]</sup>
16	DME	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.1 equiv	85	2	88
17	DME	$\text{CsF}$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.1 equiv	85	2	88
18	DME	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 0.05 equiv	85	4	56

[a] The yield was calculated after purification by chromatography on silica gel. [b] Degradation of the substrate was observed by TLC. [c] Only partial conversion of the substrate was observed by TLC.

catalyst was then studied (Table 1, entries 13–15), but none of these reactions led to an improvement in the yield, and only a few percent conversion was observed. Finally, the best results were obtained by using  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  or  $\text{CsF}$  as a base (Table 1, entries 16 and 17), which afforded efficient Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions of this substrate. Decreasing of the amount of catalyst to 0.05 equivalents led to a lower reaction yield (56% Table 1, entry 18) in comparison with the reaction conditions of entry 16, which were chosen as the most suitable.

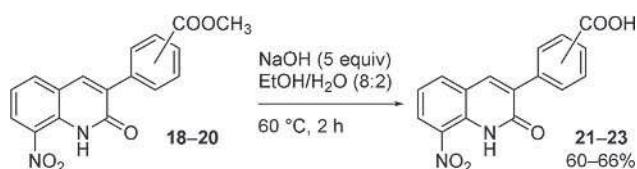
Next, the procedure was extended to 19 other arylboronic acids, to afford new derivatives bearing phenyl, thiophene, furan or pyridine moieties at position 3 of the scaffold (Scheme 2). The reactions yields were generally greater than 65 % (for 14 derivatives) but were lower for 4-hydroxyphenylboronic acid and 4-aminophenylboronic acid with 37 % and 41 % yields, respectively.



**Scheme 2.** General procedure for the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one and various arylboronic acids.

Three additional compounds (**21–23**) were synthesised by the saponification of compounds **18–20** into the carboxylic acid derivatives, using an excess of sodium hydroxide in an ethanol/water mixture (Scheme 3).

In parallel, with the aim of broadening the chemical diversity at position 3 of the scaffold and introduce alkynyl moieties, a Sonogashira cross-coupling reaction was devised. The initial conditions were adapted from a previously described protocol.<sup>[27]</sup> As presented in Table 2, after brief optimisation of the reaction between 3-bromo-8-nitroquinolinone and phenylacetylene, DME was chosen as the solvent, and the reaction was carried out at 15 °C (Table 2, entry 6). Interestingly, it was noted



**Scheme 3.** Preparation of compounds **21–23**.

that temperature had a strong influence on the reaction. At 0 °C in DME, the reaction did not take place, whereas it proceeded at 15 and 25 °C, affording compound **24**. Surprisingly, the unexpected 8-nitro-2-phenylfuro[2,3-*b*]quinoline (**25**) formed with heating at 40 °C in DME or DMF. Compound **25** was also obtained upon attempting to recrystallise **24** from acetonitrile, underlining the instability of this product. Such a consecutive Sonogashira coupling and cyclisation reaction, leading to furo[2,3-*b*]pyridine derivatives, has been reported in refs. [28] and [29].

The optimisation of both Suzuki–Miyaura and Sonogashira cross-coupling reactions led to the synthesis of 25 new molecules with either an aryl or an alkynyl group at position 3 of the scaffold. With the exception of compound **24**, which was considered too unstable, all these molecules were evaluated in vitro to determine their antikinoplastid potential. Compound **25** could not be evaluated because of low aqueous solubility.

## Compound evaluation

Initially, the cytotoxicity of these molecules was assessed in vitro on the HepG2 human cell line, and the corresponding  $\text{CC}_{50}$  values were compared with that of the reference drug doxorubicin (Table 3). The biological results showed that compounds **1–11** were not soluble enough in aqueous medium to be tested. The water solubility was improved with compounds **10**, **12–17** and **21–23** bearing either a pyridin-3-yl or a phenyl moiety at position 3 of the scaffold; the phenyl group being substituted by a hydrophilic group such as hydroxymethyl or aldehyde or an ionised carboxyl group. These compounds dis-

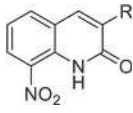
**Table 2.** Optimisation of the Sonogashira cross-coupling reactions of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one.

Entry	Solvent	Temperature [°C]	Yield <b>24</b> [%] <sup>[a]</sup>	Yield <b>25</b> [%] <sup>[a]</sup>	Time [h]
1	DMF	25	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>	48
2	THF	25	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>	48
3	$\text{Et}_3\text{N}$	25	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>	48
4	DME	25	56	0	0.25
5	DME	0	— <sup>[b]</sup>	— <sup>[b]</sup>	48
6	DME	15	72	0	1.5
7	DME	40	0	51	0.5
8	DMF	40	0	56	36

[a] The yield was calculated after purification by chromatography on silica gel. [b] Only partial conversion of the substrate was observed by TLC.



**Table 3.** In vitro antileishmanial, antitrypanosomal and cytotoxic activities of compounds **1–25** and reference standards.

Compound	R (% yield)	 $IC_{50}$ [ $\mu$ M]		HepG2 $CC_{50}$ [ $\mu$ M]	Antitrypanosomal selectivity index <sup>[g]</sup>
		<i>L. infantum</i> axenic amastigotes	<i>T. brucei brucei</i> trypomastigotes		
1	Phenyl (90)	> 12 <sup>[a]</sup>	4.7 ± 2.7	> 12 <sup>[a]</sup>	> 2
2	4-OCH <sub>3</sub> -phenyl (88)	> 6 <sup>[a]</sup>	–	> 6 <sup>[a]</sup>	–
3	4-OH-phenyl (37)	> 3 <sup>[a]</sup>	–	> 3 <sup>[a]</sup>	–
4	4-NH <sub>2</sub> -phenyl (41)	> 3 <sup>[a]</sup>	–	> 3 <sup>[a]</sup>	–
5	4-Cl-phenyl (73)	> 3 <sup>[a]</sup>	–	> 3 <sup>[a]</sup>	–
6	4-F-phenyl (70)	> 6 <sup>[a]</sup>	–	> 6 <sup>[a]</sup>	–
7	4-CF <sub>3</sub> -phenyl (60)	> 6 <sup>[a]</sup>	–	> 6 <sup>[a]</sup>	–
8	3-thienyl (92)	> 6 <sup>[a]</sup>	–	> 6 <sup>[a]</sup>	–
9	2-furyl (65)	> 3 <sup>[a]</sup>	–	> 3 <sup>[a]</sup>	–
10	3-pyridyl (62)	> 50 <sup>[a]</sup>	2.8 ± 0.8	> 25 <sup>[a]</sup>	> 9
11	4-pyridyl (71)	NS <sup>[b]</sup>	–	NS <sup>[b]</sup>	–
12	4-CH <sub>2</sub> OH-phenyl (77)	> 25 <sup>[a]</sup>	1.9 ± 0.3	> 25 <sup>[a]</sup>	> 13
13	3-CH <sub>2</sub> OH-phenyl (87)	29.3 ± 4.2	1.5 ± 0.3	> 25 <sup>[a]</sup>	> 17
14	2-CH <sub>2</sub> OH-phenyl (72)	22 ± 2.0	7.2 ± 0.6	> 100 <sup>[c]</sup>	> 14
15	4-CHO-phenyl (51)	35 ± 1.7	0.5 ± 0.1	30 ± 3.7	60
16	3-CHO-phenyl (55)	10.2 ± 0.6	5.6 ± 0.4	> 100 <sup>[c]</sup>	> 18
17	2-CHO-phenyl (65)	9.8 ± 1.2	7.5 ± 0.4	> 50 <sup>[a]</sup>	> 7
18	4-COOCH <sub>3</sub> -phenyl (72)	> 12.5 <sup>[a]</sup>	–	> 12.5 <sup>[a]</sup>	–
19	3-COOCH <sub>3</sub> -phenyl (71)	NS <sup>[b]</sup>	–	NS <sup>[b]</sup>	–
20	2-COOCH <sub>3</sub> -phenyl (71)	NS <sup>[b]</sup>	–	NS <sup>[b]</sup>	–
21	<b>4-COOH-phenyl (65)</b>	<b>&gt; 100<sup>[c]</sup></b>	<b>1.5 ± 0.2</b>	<b>120 ± 7</b>	<b>80</b>
22	3-COOH-phenyl (60)	> 100 <sup>[c]</sup>	7.5 ± 1.0	> 100 <sup>[c]</sup>	> 13
23	2-COOH-phenyl (66)	> 100 <sup>[c]</sup>	> 50 <sup>[a]</sup>	> 100 <sup>[c]</sup>	–
Initial hit <sup>[22]</sup>	Br	7.1 ± 1.5	1.9 ± 0.44	92 ± 13.0	48
8-Nitroquinolinone <sup>[22]</sup>	H	15.5 ± 0.5	23.4 ± 5.7	164 ± 28	7
Doxorubicin <sup>[d]</sup>	–	–	–	0.2 ± 0.02	–
Amphotericin B <sup>[e]</sup>	–	0.06 ± 0.001	–	7.0 ± 0.25	–
Miltefosine <sup>[e]</sup>	–	0.8 ± 0.2	–	84.5 ± 8.8	–
Fexinidazole <sup>[e,f]</sup>	–	3.3 ± 0.7	0.4 ± 0.18	> 100 <sup>[c]</sup>	> 250
Suramin <sup>[f]</sup>	–	–	0.03 ± 0.009	> 100 <sup>[c]</sup>	> 3333
Eflornithine <sup>[f]</sup>	–	–	15.8 ± 2.1	> 100 <sup>[c]</sup>	> 6

[a] The product could not be tested at higher concentrations due to low solubility in aqueous media. [b] The product was not soluble at any test concentration. [c] The  $IC_{50}$  or  $CC_{50}$  value was not reached at the highest tested concentration. [d] Doxorubicin was used as a cytotoxic reference drug. [e] Amphotericin B, miltefosine and fexinidazole were used as antileishmanial reference drugs or drug candidates. [f] Fexinidazole, suramin and eflornithine were used as antitrypanosomal reference drugs or drug candidates. [g] The antitrypanosomal selectivity index was calculated according to the following formula:  $SI = CC_{50} \text{ HepG2} / IC_{50} \text{ T. brucei brucei}$ .

played low cytotoxicity on the HepG2 human cell line with  $CC_{50}$  values > 25  $\mu$ M. The compound bearing an aldehyde group in the *para* position of the phenyl ring (**15**) was the most cytotoxic of this series with a  $CC_{50}$  value of 30  $\mu$ M.

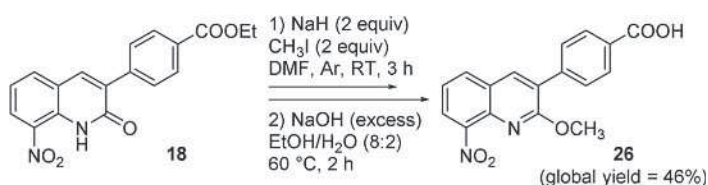
Then, all synthesised compounds were tested in vitro against *L. infantum* axenic amastigotes. Their  $IC_{50}$  values were determined and compared with those of two antileishmanial reference drugs (amphotericin B and miltefosine) and to the drug candidate fexinidazole.

With respect to antileishmanial activity, apart for aldehyde-containing compounds **16** and **17**, the tested series appeared either weakly active ( $IC_{50}$  = 22–35  $\mu$ M) or even inactive ( $IC_{50}$  > 100  $\mu$ M for carboxylic acid derivatives) toward *L. infantum* in comparison with the reference drugs. Thus, introducing an aryl moiety at position 3 of the pharmacophore did not seem to favour antileishmanial activity.

In a second assay, only the compounds with appropriate aqueous solubility were tested in vitro against *T. brucei brucei* trypomastigotes and compared with reference antitrypanosomal drugs (suramin and eflornithine) and the drug candidate fexinidazole. All tested molecules displayed good antitrypanosomal activity ( $0.5 \mu\text{M} \leq IC_{50} \leq 7.5 \mu\text{M}$ ), better than that of eflornithine ( $IC_{50}$  = 15.8  $\mu$ M) and similar to that of fexinidazole ( $IC_{50}$  = 0.4  $\mu$ M). Interestingly, compounds substituted at the *ortho* position of the phenyl ring (**14**, **17**, **23**) displayed higher  $IC_{50}$  values than their *meta*- and *para*-substituted analogues. Compounds with a *para*-substituted phenyl ring generally showed lower  $IC_{50}$  values than their *meta*-substituted analogues, for example, **15** being 11 times more potent than **16**, and **21** five times more potent than **22**. Compounds **15** and **21** appeared to be the most promising antitrypanosomal molecules in this series with respective  $IC_{50}$  values of 0.5 and

1.5  $\mu\text{M}$ . Compound **21** emerged as a new antitrypanosomal hit, with an activity against *T. brucei brucei* close to that of the parent compound ( $\text{IC}_{50}$  = 1.9  $\mu\text{M}$ ) but with a better cytotoxicity profile, leading to a better selectivity index ( $\text{SI}$  = 80 versus 48 for the initial hit). By comparison with reference drugs, **21** appears less active than suramin but more active than eflornithine. With respect to fexinidazole, another nitroheterocycle, compound **21** presents the same cytotoxic profile with  $\text{CC}_{50}$  = 120  $\mu\text{M}$ , and is three times less active than the drug candidate. Indeed, unlike fexinidazole and 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one, compound **21** displayed a selective antitrypanosomal activity, being inactive ( $\text{IC}_{50}$  > 100  $\mu\text{M}$ ) against *L. infantum*. This is a first indicator that molecule **21** shows a specific antiparasitic profile in the studied series.

Finally, the *O*-methylated analogue of hit compound **21** (**26**) was synthesised in two steps: *O*-methylation of **18**, using methyl iodide in DMF under an inert atmosphere, followed by saponification by the same procedure as described for compounds **21**–**23** (Scheme 4). Compound **26** was then tested in vitro against both *L. infantum* and *T. brucei brucei* (Figure 4).



Scheme 4. Preparation of compound **26**.

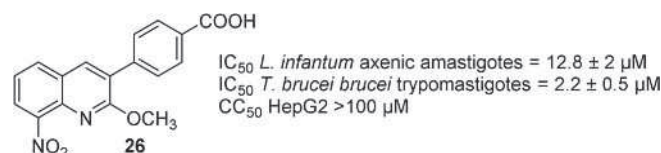


Figure 4. In vitro antiparasitic activities and cytotoxicity of compound **26**.

It was as active against *T. brucei brucei* as **21** ( $\text{IC}_{50}$  = 2.2  $\mu\text{M}$ ). Compound **26** was also active against *L. infantum* ( $\text{IC}_{50}$  = 12.8  $\mu\text{M}$ ), whereas **21** was not ( $\text{IC}_{50}$  > 100  $\mu\text{M}$ ). These results are surprising, considering that the hydrogen bond between the lactam function and the nitro group appeared mandatory for conferring antileishmanial activity on the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one series by increasing the reduction potential.<sup>[22]</sup> This is a second indicator that the introduction of an aryl group at position 3 of the 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one scaffold might lead to a new antiketoplasid mechanism of action, different from that of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one.

To assess if the antitrypanosomal nitroheterocycle **21** was bioactivated by the NTR of *T. brucei brucei*, its  $\text{IC}_{50}$  value was measured on both a wild-type *T. brucei brucei* trypomastigote strain and a NTR-overexpressing strain (Table 4). The results were compared with those obtained for the initial hit.<sup>[22]</sup> The latter is clearly bioactivated by the trypanosomal NTR, being 4.5-fold more active against the strain overexpressing the NTR

Table 4. Study of the bioactivation of **21** by trypanosomal nitroreductase.

Compound	<i>T. brucei brucei</i> trypomastigotes $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		Fold change
	Wild-type strain	NTR-overexpressing strain	
<b>21</b>	5.4 ± 0.12	4.2 ± 0.2	1.3
Initial hit	17.7 ± 1.0	3.9 ± 0.1	4.5
Nifurtimox	1.9 ± 0.05	0.6 ± 0.05	3.1

than the wild type, whereas **21** is only 1.3 times more active on the strain overexpressing the NTR. This result is a third piece of evidence that suggests that **21**, which is less intensively bioactivated by the trypanosomal NTR than the initial hit, could act on another parasite target. This assay also showed that compound **21** presents the same level of activity toward *T. brucei brucei* than the drug nifurtimox, which was used as a bioactivation control.

In parallel, an electrochemistry study was carried out by measuring in DMSO the reduction potentials of five 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one derivatives bearing an aryl group at position 3, using cyclic voltammetry (Table 5). For all compounds, a reversible single-electron reduction was observed (formation of an anion radical). The redox potentials of the new compounds bearing an aryl group at position 3 ranged between −0.53 and −0.59 V, higher than for the initial hit (−0.45 V) but similar to that of 8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (−0.54 V). As previously noted in the studied series,<sup>[22]</sup> the *O*-methylation of compound **21** to give **24**, is responsible for an important decrease in the redox potential value from −0.56 to −0.93 V. This shift is mainly due to the removal of the intramolecular hydrogen bond between the lactam function and the nitro group. It can be concluded that the introduction of a phenyl ring at the position 3 of the scaffold has no significant impact on the redox potential of the studied series but that it allows access to novel antitrypanosomal molecules that display lower reduction potential than the initial hit with the same level of efficacy.

Thus, to understand the selective antitrypanosomal activity of **21**, other parasitic targets should be investigated. Among the parasitic targets that were recently reported in literature concerning the antitrypanosomal activity of new diverse nitroheterocycles, *S*-adenosylmethionine decarboxylase was identified by a high-throughput mass spectrometry-based assay conducted on 400 000 molecules,<sup>[30]</sup> and should be considered.

## Conclusion

An optimised Suzuki–Miyaura reaction at position 3 of 3-bromo-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one led to the synthesis of 24 new derivatives. These molecules were screened in vitro against *L. infantum* and *T. brucei brucei* to evaluate their antiketoplastid potential. Among these molecules, a new selective antitrypanosomal hit **21**, bearing a *para*-carboxyphenyl group, was identified. Compound **21** was not cytotoxic on the HepG2 human cell line ( $\text{CC}_{50}$  = 120  $\mu\text{M}$ ), displayed good antitrypanoso-

**Table 5.** Effects of substitution of the phenyl ring on reduction potentials  $E^\circ$  in the Suzuki–Miyaura series.

Compound	Structure	$E^\circ$ [V] <sup>[a]</sup>
1		−0.59
7		−0.53
13		−0.53
21		−0.56
26		−0.93
Initial hit		−0.45
8-Nitroquinolin-2(1H)-one		−0.54

[a] Cyclic voltammetry conditions: DMSO/TBAPF<sub>6</sub>, SCE/GC; one-electron reversible reduction; values are expressed in V versus NHE.

mal activity ( $IC_{50}$  = 1.5  $\mu$ M, SI = 80), which is better than that of the drug eflornithine and similar to that of fexinidazole, a 5-nitroimidazole in phase III of clinical trials against HAT. Interestingly, **21** was inactive against *L. infantum*, showing a parasitic selectivity among kinetoplastids. Unlike fexinidazole and the previously identified hit molecule in the series, this molecule was not efficiently metabolised by the type I trypanosomal NTR, suggesting a probable alternative mechanism of action in this series.

## Experimental Section

### Chemistry

All reagents and solvents were obtained from commercial sources (Fluorochem, Sigma–Aldrich or Alfa Aesar) and used as received. The progress of the reactions was monitored on ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey–Nagel) pre-coated thin layer chromatography (TLC) sheets and were visualised under ultraviolet light at 254 nm.

The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on Bruker UltraShield 300 MHz, Bruker IconNMR 400 MHz or Bruker Avance NEO 600 MHz instruments at the Laboratoire de Chimie de Coordination, and data are presented as follows: chemical shift  $\delta$  in parts per million (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as reference, coupling constant  $J$  in Hertz (Hz), and multiplicity: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublets of doublets; m, multiplet; brs, broad singlet. Melting points were measured on a Stuart Melting Point SMP3 instrument. High-resolution mass measurements were recorded on a GCT Premier Spectrometer (DCI, CH<sub>4</sub>) or Xevo G2 QTOF (Waters, ESI+) instrument at the Université Paul Sabatier, Toulouse (France). Microwave reactions were performed in a CEM Discover microwave reactor.

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one was prepared according to a previously reported procedure.<sup>[22]</sup>

### General procedure for the preparation of compounds 1–20 and 25

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one (300 mg, 1.1 mmol, 1 equiv), cesium carbonate (1.1 g, 3.3 mmol, 3 equiv), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (127 mg, 0.12 mmol, 0.1 equiv) and the appropriate phenylboronic acid (1.2 equiv) were added in a sealed 25 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous DME (10 mL) was then added. The reaction mixture was heated at 85 °C in a microwave reactor for 2 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with dichloromethane (3 × 100 mL). The organic layers were combined, washed with water, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel and recrystallised if necessary to give compounds 1–20 or 25.

**8-Nitro-3-phenylquinolin-2(1H)-one (1)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (97:3) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (264 mg, 0.99 mmol, 90%).  $T_{dec}$  = 177 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.31–7.35 (m, 1H; H6), 7.41–7.50 (m, 3H; H3', H4' and H5'), 7.75–7.77 (m, 2H; H2' and H6'), 7.91 (s, 1H; H4), 7.94 (dd,  $J$  = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.49 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.40 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 121.4 (CH), 122.7 (C), 127.3 (CH), 128.5 (2 × CH), 128.7 (2 × CH), 129.1 (CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 134.5 (C), 134.6 (C), 135.6 (CH), 136.7 (CH), 161.0 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 267.0770 [ $M$  + H]<sup>+</sup>; found: 267.0762.

**3-(4-Methoxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (2)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (95:5) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield an orange solid (287 mg, 0.97 mmol, 88%); mp: 229 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 3.87 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 6.99–7.02 (m, 2H; H3' and H5'), 7.29–7.33 (m, 1H; H6), 7.73–7.77 (m, 2H; H2' and H6'), 7.87 (s, 1H; H4), 7.91 (dd,  $J$  = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.47 (dd,  $J$  = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.38 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  = 55.4 (CH<sub>3</sub>), 114.0 (2 × CH), 121.3 (CH), 122.9 (C), 125.6 (C), 126.9 (CH), 130.0 (2 × CH), 132.7 (C), 132.9 (C), 134.0 (C), 135.3 (CH), 135.4 (CH), 160.3 (C), 161.2 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 297.0875 [ $M$  + H]<sup>+</sup>; found: 297.0864.

**3-(4-Hydroxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (3)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (75:25) as eluent to yield an orange solid (115 mg, 0.41 mmol, 37%); mp: 266 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 6.84–6.88 (m, 2H; H3' and H5'), 7.40–7.44 (m, 1H; H6), 7.67–7.71 (m, 2H; H2' and H6'), 8.20 (dd,  $J$  = 7.7, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.26 (s, 1H; H4), 8.40 (dd,  $J$  = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 9.74 (s, 1H; OH), 11.12 ppm (brs, 1H; NH);

<sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 75 MHz):  $\delta$  = 115.4 (2 $\times$ CH), 122.0 (CH), 122.8 (C), 125.8 (C), 127.1 (CH), 130.4 (2 $\times$ CH), 132.3 (C), 132.5 (C), 133.5 (C), 136.0 (CH), 136.1 (CH), 158.5 (C), 160.8 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 283.0719 [M+H]<sup>+</sup>; found: 283.0706.

**3-(4-Aminophenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (4)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (95:5) as eluent to yield an orange solid (128 mg, 0.45 mmol, 41%); mp: 280 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 5.44 (s, 2H; NH<sub>2</sub>), 6.61–6.65 (m, 2H; H3' and H5'), 7.37–7.41 (m, 1H; H6), 7.58–7.62 (m, 2H; H2' and H6'), 8.15–8.18 (m, 2H; H4 and H5), 8.36 (dd,  $J$  = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.07 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 100 MHz):  $\delta$  = 113.6 (2 $\times$ CH), 121.9 (CH), 122.1 (C), 123.1 (C), 126.5 (C), 129.9 (2 $\times$ CH), 131.9 (C), 132.9 (C), 133.4 (C), 134.1 (CH), 135.8 (CH), 150.0 (CH), 161.0 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 282.0879 [M+H]<sup>+</sup>; found: 282.0874.

**3-(4-Chlorophenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (5)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (97:3) as eluent to yield a yellow solid (241 mg, 0.80 mmol, 73%); mp: 222 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.40–7.42 (m, 2H; H3' and H5'), 7.66–7.75 (m, 2H; H2' and H6'), 7.92 (s, 1H; H4), 7.95 (dd,  $J$  = 7.6, 1.5 Hz, 1H; H5), 8.51 (dd,  $J$  = 8.4, 1.5 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 121.6 (CH), 122.4 (C), 126.9 (CH), 127.7 (CH), 128.7 (CH), 129.1 (CH), 129.7 (CH), 132.8 (C), 133.1 (C), 133.2 (C), 134.4 (C), 135.7 (CH), 136.2 (C), 137.3 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 301.0380 [M+H]<sup>+</sup>; found: 301.0373.

**3-(4-Fluorophenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (6)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (219 mg, 0.77 mmol, 70%); mp: 217 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.12–7.20 (m, 2H; H2' and H6'), 7.31–7.36 (m, 1H; H6), 7.73–7.80 (m, 2H; H3' and H5'), 7.89 (s, 1H; H4), 7.94 (dd,  $J$  = 7.6, 1.5 Hz, 1H; H5), 8.50 (dd,  $J$  = 8.4, 1.5 Hz, 1H; H7), 11.41 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 115.5 (d,  $J$  = 21.6 Hz, 2 $\times$ CH), 121.5 (CH), 122.6 (C), 124.4 (C), 127.4 (CH), 130.6 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2 $\times$ CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 133.5 (C), 135.5 (CH), 136.5 (CH), 160.9 (C), 163.2 ppm (d,  $J$  = 249.2 Hz, C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 285.0675 [M+H]<sup>+</sup>; found: 285.0676.

**8-Nitro-3-(4-trifluoromethylphenyl)quinolin-2(1H)-one (7)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (220 mg, 0.66 mmol, 60%); mp: 168 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.34–7.38 (m, 1H; H6), 7.72–7.75 (m, 2H; H2' and H6'), 7.88 (m, 2H; H3' and H5'), 7.95–7.98 (m, 2H; H4 and H5), 8.53 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz):  $\delta$  = 121.7 (CH), 122.4 (C), 124.0 (q,  $J$  = 272.3 Hz, C), 125.4 (q,  $J$  = 3.7 Hz, 2 $\times$ CH), 127.9 (CH), 129.1 (2 $\times$ CH), 130.9 (q,  $J$  = 32.5 Hz, C), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (C), 135.8 (CH), 137.6 (CH), 138.0 (C), 160.5 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 335.0644 [M+H]<sup>+</sup>; found: 335.0629.

**8-Nitro-3-(thiophen-3-yl)quinolin-2(1H)-one (8)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate (98:2) as eluent to yield a yellow solid (275 mg, 1.01 mmol, 92%); mp: 199 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.31–7.35 (m, 1H; H6), 7.41–7.43 (m, 1H; H4'), 7.59 (dd,  $J$  = 5.1, 1.3 Hz, 1H; H5'), 7.94 (dd,  $J$  = 7.7, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.05 (s, 1H; H4), 8.39 (dd,  $J$  = 3.0, 1.3 Hz, 1H; H2'), 8.48 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  = 121.4 (CH), 122.6 (C), 123.6 (C), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 127.0 (CH), 127.1 (CH), 128.6 (C), 132.4 (C), 134.1 (CH), 134.3 (C), 135.4 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 273.0334 [M+H]<sup>+</sup>; found: 273.0330.

**3-(2-Furanyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (9)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent to yield a dark red solid (183 mg, 0.71 mmol, 65%); mp: 257 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  = 6.58 (dd,  $J$  = 3.3 Hz, 1.9 Hz, 1H; H4'), 7.30–7.35 (m, 1H; H6), 7.55–7.56 (m, 2H; H3' and H5'), 7.96 (dd,  $J$  = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.23 (s, 1H; H4), 8.46 (dd,  $J$  = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 112.6 (CH), 114.2 (CH), 121.6 (CH), 122.5 (C), 123.6 (C), 126.9 (CH), 130.7 (CH), 132.0 (C), 132.8 (C), 135.5 (CH), 143.3 (CH), 147.7 (C), 158.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 257.0562 [M+H]<sup>+</sup>; found: 257.0558.

**8-Nitro-3-(pyridin-3-yl)quinolin-2(1H)-one (10)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl acetate as eluent to yield a yellow solid (182 mg, 0.68 mmol, 62%); mp: 237 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.35–7.39 (m, 1H; H6), 7.40–7.43 (m, 1H; H5'), 7.97–7.99 (m, 2H; H4 and H5), 8.20–8.23 (m, 1H; H6'), 8.53 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.66 (dd,  $J$  = 4.9, 1.7 Hz, 1H; H4'), 8.90 (dd,  $J$  = 2.3, 0.9 Hz, 1H; H2'), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  = 121.7 (CH), 122.3 (C), 123.1 (CH), 127.9 (CH), 130.5 (C), 131.4 (C), 132.8 (C), 133.3 (C), 135.8 (CH), 136.4 (CH), 137.2 (CH), 149.0 (CH), 150.0 (CH), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 268.0722 [M+H]<sup>+</sup>; found: 268.0712.

**8-Nitro-3-(pyridin-4-yl)quinolin-2(1H)-one (11)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (80:20) as eluent to yield a yellow solid (209 mg, 0.78 mmol, 71%); mp: 297 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 7.36–7.40 (m, 1H; H6), 7.70–7.72 (m, 2H; H2' and H6'), 7.98 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.03 (s, 1H; H4), 8.55 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.73–8.74 (m, 2H; H3' and H5'), 11.46 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D, 100 MHz):  $\delta$  = 121.6 (C), 123.7 (CH), 126.1 (C), 126.7 (2 $\times$ CH), 130.7 (CH), 132.4 (C), 133.4 (C), 137.5 (CH), 140.6 (2 $\times$ CH), 144.1 (CH), 153.5 (C), 161.1 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 268.0722 [M+H]<sup>+</sup>; found: 268.0713.

**3-(4-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (12)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (251 mg, 0.85 mmol, 77%); mp: 219 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 4.56 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 5.26 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H; OH), 7.41–7.46 (m, 3H; H6, H3' and H5'), 7.76–7.79 (m, 2H; H2' and H6'), 8.23 (dd,  $J$  = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.36 (s, 1H; H4), 8.43 (dd,  $J$  = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.17 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 100 MHz):  $\delta$  = 63.1 (CH<sub>2</sub>), 122.1 (CH), 122.6 (C), 126.6 (2 $\times$ CH), 127.6 (CH), 128.8 (2 $\times$ CH), 132.6 (C), 132.7 (C), 133.6 (C), 134.0 (C), 136.4 (CH), 137.6 (CH), 143.6 (C), 160.8 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 297.0875 [M+H]<sup>+</sup>; found: 297.0878.

**3-(3-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (13)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (267 mg, 0.90 mmol, 82%); mp: 155 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 300 MHz):  $\delta$  = 4.58 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 5.27 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H; OH), 7.37–7.47 (m, 3H; H6, H4' and H5'), 7.66–7.68 (m, 1H; H6'), 7.73–7.75 (m, 1H; H2'), 8.25 (dd,  $J$  = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.35 (s, 1H; H4), 8.44 (dd,  $J$  = 8.3 and 1.4 Hz, 1H; H7), 11.17 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 75 MHz):  $\delta$  = 63.3 (CH<sub>2</sub>), 122.1 (CH), 122.6 (C), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 128.4 (CH), 132.7 (C), 133.0 (C), 133.7 (C), 135.1 (C), 136.5 (CH), 138.0 (CH), 142.9 (C), 160.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>):  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 297.0875 [M+H]<sup>+</sup>; found: 297.0861.

**3-(2-Hydroxymethylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (14)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/



ethyl acetate (50:50) as eluent to yield a yellow solid (235 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 208 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 MHz): δ = 4.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 5.09 (s, 1H; OH), 7.28 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H; H3'), 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.42–7.46 (m, 2H; H4' and H5'), 7.57 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H; H6'), 8.12 (s, 1H; H4), 8.19 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.45 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.19 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 63.7 (CH<sub>2</sub>), 121.9 (CH), 122.5 (C), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 129.8 (CH), 130.1 (CH), 130.6 (CH), 132.7 (C), 133.1 (C), 133.9 (C), 135.7 (CH), 135.8 (C), 139.2 (CH), 139.9 (C), 162.2 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 297.0875 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 297.0869.

**3-(4-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (15)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/cyclohexane (80:20) as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (165 mg, 0.56 mmol, 51%); mp: 243 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ = 7.34–7.39 (m, 1H; H6), 7.93–8.00 (m, 6H; H4, H5, H2', H3', H5' and H6'), 8.53 (dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.08 (s, 1H; CHO), 11.45 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.3 (C), 128.0 (CH), 129.4 (2×CH), 129.8 (2×CH), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (C), 135.9 (CH), 136.4 (C), 137.9 (CH), 140.5 (C), 160.5 (C), 191.7 ppm (CH); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 295.0719 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 295.0710.

**3-(3-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (16)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/acetone (75:25) as eluent to yield a yellow solid (104 mg, 0.35 mmol, 32%); mp: 209 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ = 7.34–7.39 (m, 1H; H6), 7.63–7.69 (m, 1H; H5'), 7.94–7.99 (m, 2H; H5 and H6'), 8.01 (s, 1H; H4), 8.10–8.13 (m, 1H; H4'), 8.25–8.26 (m, 1H; H2'), 8.53 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.10 (s, 1H; CHO), 11.5 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 121.7 (CH), 122.4 (C), 127.8 (CH), 129.2 (CH), 129.7 (CH), 130.2 (CH), 132.8 (C), 133.1 (C), 133.3 (C), 134.7 (CH), 135.6 (C), 135.8 (CH), 136.6 (C), 137.5 (CH), 160.7 (C), 192.0 ppm (CH); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 295.0719 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 295.0713.

**3-(2-Formylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (17)** was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (60:40) as eluent to yield a yellow solid (210 mg, 0.71 mmol, 65%); mp: 230–231 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.44 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H; H6'), 7.61–7.65 (m, 1H; H4'), 7.68–7.72 (m, 1H; H5'), 7.82 (s, 1H; H4), 7.93 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H; H3'), 7.99 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.53 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 10.03 (s, 1H; CHO), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 121.6 (CH), 122.3 (C), 127.8 (CH), 129.5 (CH), 130.8 (CH), 131.0 (CH), 133.0 (C), 133.7 (C), 133.9 (CH), 134.5 (C), 135.0 (C), 135.7 (CH), 136.1 (C), 138.0 (CH), 160.8 (C), 191.2 ppm (CH); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 295.0719 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 295.0718.

**3-(4-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (18)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent, and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (257 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 245 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ = 3.95 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 7.33–7.38 (m, 1H; H6), 7.84–7.87 (m, 2H; H2' and H6'), 7.95–7.97 (m, 2H; H4 and H5), 8.12–8.15 (m, 2H; H3' and H5'), 8.52 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.43 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 52.3 (CH<sub>3</sub>), 121.6 (CH), 122.4 (C), 127.8 (CH), 128.7 (2×CH), 129.7 (2×CH), 130.4 (C), 132.8 (C), 133.3 (C), 133.5 (C), 135.8 (CH), 137.6 (CH), 139.0 (C), 160.6 (C), 166.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 325.0824 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 325.0818.

**3-(3-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (19)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/

cyclohexane (90:10) as eluent to yield a yellow solid (253 mg, 0.78 mmol, 71%); mp: 212 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.95 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 7.33–7.37 (m, 1H; H6), 7.53–7.58 (m, 1H; H5'), 7.96 (dd, *J* = 7.7 Hz, 1.4 Hz, 1H; H5), 7.98 (s, 1H; H4), 8.05–8.11 (m, 2H; H4' and H6'), 8.36–8.37 (m, 1H; H2'), 8.51 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H; H7), 11.42 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 52.3 (CH<sub>3</sub>), 121.6 (CH), 122.5 (C), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 129.6 (CH), 130.0 (CH), 130.5 (C), 132.8 (C), 133.2 (C), 133.4 (CH), 133.5 (C), 134.8 (C), 135.7 (CH), 137.3 (CH), 160.7 (C), 166.7 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 325.0824 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 325.0809.

**3-(2-Methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (20)** was purified by chromatography on silica gel using cyclohexane/acetone (70:30) as eluent to yield a yellow solid (257 mg, 0.79 mmol, 72%); mp: 212 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 3.82 (s, 3H; CH<sub>3</sub>), 7.29–7.33 (m, 1H; H6), 7.37–7.39 (m, 1H; H6'), 7.49–7.53 (m, 1H; H4'), 7.60–7.64 (m, 1H; H5'), 7.77 (s, 1H; H4), 7.91 (d, *J* = 7.65 Hz, 1H; H3'), 8.02 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H; H5), 8.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H; H7), 11.34 ppm (brs, 1H; NH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 52.3 (CH<sub>3</sub>), 121.4 (CH), 122.7 (C), 127.2 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 130.6 (CH), 131.0 (C), 132.4 (CH), 132.9 (C), 133.4 (C), 135.5 (CH), 135.6 (CH), 135.8 (C), 137.0 (C), 160.9 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 325.0824 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 325.0819.

#### General procedure for the preparation of compounds 21–23

A mixture of H<sub>2</sub>O/ethanol (2:8, 40 mL) was added to 1 equiv (200 mg) of the 3-(methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one derivative (**18–20**). Then, NaOH (5 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 3 h. The reaction mixture was then poured into water, acidified to pH 1 with 37% HCl, and extracted with dichloromethane (2×50 mL) and ethyl acetate (2×50 mL). The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel and recrystallised if necessary to give compound **21**, **22** or **23**.

**3-(4-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (21)** was washed with dilute aqueous hydrochloric acid and recrystallised from acetonitrile to yield a yellow solid (124 mg, 0.40 mmol, 65%); mp: > 310 °C; <sup>1</sup>H NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 400 MHz): δ = 7.45–7.49 (m, 1H; H6), 7.93–7.96 (m, 2H; H2' and H6'), 8.03–8.06 (m, 2H; H3' and H5'), 8.26 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.46 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.49 (s, 1H; H4), 11.23 (brs, 1H; NH), 13.07 ppm (brs, 1H; COOH); <sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 100 MHz): δ = 122.3 (CH), 122.35 (C), 128.1 (CH), 129.2 (2×CH), 129.6 (2×CH), 131.0 (C), 131.7 (C), 132.8 (C), 133.8 (C), 136.7 (CH), 139.1 (CH), 139.5 (C), 160.4 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 311.0668 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 311.0669.

**3-(3-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (22)** was washed with dilute aqueous hydrochloric acid and recrystallised from acetonitrile to yield a brown solid (88 mg, 0.28 mmol, 42%). *T*<sub>dec</sub> = 305–306 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 7.44–7.48 (m, 1H; H6), 7.60–7.64 (m, 1H; H5'), 8.00–8.02 (m, 1H; H6'), 8.03–8.06 (m, 1H; H4'), 8.27 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H; H5), 8.39–8.40 (m, 1H; H2'), 8.46 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H; H7), 8.47 (s, 1H; H4), 11.22 (brs, 1H; NH), 13.05 ppm (brs, 1H; COOH); <sup>13</sup>C NMR ([D<sub>6</sub>]DMSO, 100 MHz): δ = 122.2 (CH), 122.5 (C), 127.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 131.3 (C), 131.8 (C), 132.8 (C), 133.4 (CH), 133.7 (C), 135.6 (C), 136.7 (CH), 138.6 (CH), 160.5 (C), 167.6 ppm (C); HRMS (DCI, CH<sub>4</sub>): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 311.0668 [*M* + H]<sup>+</sup>; found: 311.0672.

**3-(2-Carboxyphenyl)-8-nitroquinolin-2(1*H*)-one (23)** was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane/ethyl ace-

tate (50:50) as eluent to yield a yellow solid (109 mg, 0.35 mmol, 57%).  $T_{\text{dec}} = 282\text{--}285^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 400 MHz):  $\delta = 7.43\text{--}7.48$  (m, 2H; H6 and H6'), 7.54–7.58 (m, 1H; H4'), 7.66–7.70 (m, 1H; H5'), 7.91 (dd,  $J = 7.7$ , 1.4 Hz, 1H; H5), 8.13 (s, 1H; H4), 8.20 (dd,  $J = 7.8$ , 1.4 Hz, 1H; H3'), 8.42 (dd,  $J = 8.3$ , 1.4 Hz, 1H; H7); 11.08 (brs, 1H; NH), 12.72 ppm (brs, 1H; COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 100 MHz):  $\delta = 122.1$  (CH), 122.6 (C), 127.4 (CH), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 131.3 (CH), 132.4 (CH), 132.5 (C), 132.7 (C), 133.9 (C), 136.1 (CH), 136.2 (C), 136.3 (CH), 136.4 (C), 160.7 (C), 168.4 ppm (C); HRMS (DCI,  $\text{CH}_4$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5$ : 311.0668  $[M+H]^+$ ; found: 311.0673.

#### Preparation of 8-nitro-3-phenylethynylquinolin-2(1H)-one (24)

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one (100 mg, 0.37 mmol, 1 equiv) previously synthesised in our team, CuI (7 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (43 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) were added to a sealed 10 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous dimethoxyethane (5 mL),  $\text{Et}_3\text{N}$  (155  $\mu\text{L}$ , 1.11 mmol, 3 equiv) and phenylacetylene (61  $\mu\text{L}$ , 0.56 mmol, 1.5 equiv) were successively added. The reaction mixture was cooled at  $15^\circ\text{C}$  for 1.5 h. The reaction mixture was poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layers were combined, washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent to yield **24** as a yellow solid (78 mg, 0.27 mmol, 72%); mp:  $186\text{--}187^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7.31\text{--}7.35$  (m, 1H; H6), 7.37–7.38 (m, 2H; H3', H4' and H5'), 7.59–7.63 (m, 2H; H2' and H6'), 7.87 (dd,  $J = 7.6$ , 1.5 Hz, 1H; H5), 8.06 (s, 1H; H4), 8.49 (dd,  $J = 8.4$ , 1.4 Hz, 1H; H7), 11.40 ppm (brs, 1H; NH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta = 83.4$  (C), 97.3 (C), 119.6 (C), 121.8 (CH), 122.0 (C), 122.1 (C), 128.0 (CH), 128.4 (2 $\times$ CH), 129.2 (CH), 132.1 (2 $\times$ CH), 133.0 (C), 133.0 (C), 135.3 (CH), 141.6 (CH), 159.9 ppm (C); HRMS (DCI,  $\text{CH}_4$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$ : 291.0770  $[M+H]^+$ ; found: 291.0776.

#### Preparation of 8-nitro-2-phenyl-furo[2,3-b]quinoline (25)

3-Bromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one (100 mg, 0.37 mmol, 1 equiv) previously synthesised in our team, CuI (7 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (43 mg, 0.037 mmol, 0.1 equiv) were added to a sealed 10 mL flask. Under an argon atmosphere, anhydrous dimethoxyethane (5 mL),  $\text{Et}_3\text{N}$  (155  $\mu\text{L}$ , 1.11 mmol, 3 equiv) and phenylacetylene (61  $\mu\text{L}$ , 0.56 mmol, 1.5 equiv) were successively added. The reaction mixture was heated at  $40^\circ\text{C}$  for 30 min. The reaction mixture was then poured into water and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as an eluent and isolated to yield **25** as a grey solid (55 mg, 0.19 mmol, 51%); mp:  $226^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7.16$  (s, 1H; H3), 7.45–7.55 (m, 3H; H3', H4' and H5'), 7.56–7.59 (m, 1H; H6), 7.99–8.02 (m, 2H; H2' and H6'), 8.08 (dd,  $J = 7.5$ , 1.4 Hz, 1H; H5), 8.14 (dd,  $J = 8.3$ , 1.4 Hz, 1H; H7), 8.41 ppm (s, 1H; H4);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta = 99.2$  (CH), 123.3 (CH), 123.4 (CH), 124.0 (C), 125.9 (2 $\times$ CH), 127.7 (C), 128.2 (CH), 128.6 (C), 129.1 (2 $\times$ CH), 130.5 (CH), 132.0 (CH), 136.0 (C), 147.7 (C), 159.6 (C), 162.4 ppm (C); HRMS (DCI,  $\text{CH}_4$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$ : 291.0770  $[M+H]^+$ ; found: 291.0768.

#### Preparation of 3-(4-carboxyphenyl)-2-methoxy-8-nitroquinoline (26)

Under an argon atmosphere, 3-(4-methoxycarbonylphenyl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one (260 mg, 0.80 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL). This solution was then added to 60% sodium hydride (64 mg, 1.6 mmol, 2 equiv) in DMF (5 mL). After 10 min of stirring at RT, methyl iodide (100  $\mu\text{L}$ , 1.6 mmol, 2 equiv) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at RT overnight, before being poured over ice. A precipitate formed and was filtered off and washed with water. The precipitate was dissolved in dichloromethane and this solution was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and evaporated in vacuo. The crude residue was purified by chromatography on silica gel using dichloromethane as eluent. The resulting white solid intermediate was dissolved in a mixture of  $\text{H}_2\text{O}$ /ethanol (2:8, 40 mL). NaOH (excess, solid) was then added, and the reaction mixture was stirred at  $80^\circ\text{C}$  for 2 h. The reaction mixture was then poured into water, acidified to pH 1 with 37% HCl, and extracted with dichloromethane (2 $\times$ 50 mL) and ethyl acetate (2 $\times$ 50 mL). The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and evaporated in vacuo. The residue was washed with alkaline water (pH 8) to yield **26** as a white solid (87 mg, 0.27 mmol, 61%).  $T_{\text{dec}} = 270\text{--}274^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 400 MHz):  $\delta = 4.00$  (s, 3H;  $\text{CH}_3$ ), 7.61–7.65 (m, 1H; H6), 7.80–7.82 (m, 2H; H2' and H6'), 8.05–8.07 (m, 2H; H3' and H5'), 8.23 (dd,  $J = 7.8$ , 1.4 Hz, 1H; H5), 8.27 (dd,  $J = 8.1$ , 1.4 Hz, 1H; H7), 8.56 (s, 1H; H4), 13.07 ppm (brs, 1H; NH);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 100 MHz):  $\delta = 54.5$  ( $\text{CH}_3$ ), 124.1 (CH), 124.7 (C), 126.6 (CH), 127.0 (C), 129.7 (2 $\times$ CH), 130.0 (2 $\times$ CH), 130.9 (C), 132.7 (CH), 136.7 (C), 139.3 (CH), 140.0 (C), 146.2 (C), 160.8 (C), 167.5 ppm (C); HRMS (DCI,  $\text{CH}_4$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$ : 325.0824  $[M+H]^+$ ; found: 325.0822.

#### Electrochemistry

Voltammetric measurements were carried out with a potentiostat Autolab PGSTAT100 (ECO Chemie, The Netherlands) controlled by GPES 4.09 software. Experiments were performed at room temperature in a homemade airtight three-electrode cell connected to a vacuum/argon line. The reference electrode consisted of a saturated calomel electrode (SCE) separated from the solution by a bridge compartment. The counter electrode was a platinum wire with an apparent surface area of approximately  $1\text{ cm}^2$ . The working electrode was a GC microdisk (1.0 mm diameter; Bio-logic SAS). The supporting electrolyte  $[\text{nBu}_4\text{N}][\text{PF}_6]$  (99% puriss electrochemical grade, Fluka) and the solvent DMSO (Sigma-Aldrich puriss p.a., dried, <0.02% water) were used as received and simply degassed under argon. The solutions used during the electrochemical studies were typically  $10^{-3}$  and 0.1 M with respect to test compound and supporting electrolyte, respectively. Before each measurement, the solutions were degassed by bubbling argon, and the working electrode was polished with a polishing machine (Presi P230). Under these experimental conditions, the half-wave potential ( $E_{1/2}$ ) of the ferrocene  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  couple in DMSO was  $E_{1/2} = 0.45\text{ V}$  versus SCE. Experimental peak potentials were measured versus SCE and converted to NHE by adding 0.241 V.

#### Biology

##### Antileishmanial activity on *L. infantum axenic amastigotes*<sup>[31]</sup>

*L. infantum* promastigotes (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Leishmania, Montpellier, France, expressing luciferase activity) in the logarithmic phase, cultivated in RPMI 1640 medium supplemented

with 5% foetal calf serum, L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin), were centrifuged at 900 *g* for 10 min. The supernatant was removed carefully and was replaced by the same volume of RPMI 1640 complete medium at pH 5.4 and incubated for 24 h at 24 °C. The acidified promastigotes were incubated for 24 h at 37 °C in a ventilated flask. Promastigotes were then transformed into axenic amastigotes. The effects of the test compounds on the growth of *L. infantum* axenic amastigotes were assessed as follows. *L. infantum* amastigotes were incubated at a density of 2 × 10<sup>6</sup> parasites mL<sup>-1</sup> in sterile 96-well plates with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (final concentration < 0.5% v/v), in duplicate. The appropriate controls DMSO, amphotericin B, miltefosine and fexinidazole (reference drugs purchased from Sigma-Aldrich) were added to each set of experiments. After a 48 h incubation period at 37 °C, each well was examined by microscope for precipitate formation. To estimate the luciferase activity of axenic amastigotes, 80 µL of each well were transferred to white 96-well plates. Steady Glow reagent (Promega) was added according to the manufacturer's instructions, and plates were incubated for 2 min. The luminescence was measured using a Microbeta luminescence counter (PerkinElmer). IC<sub>50</sub> was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the metabolic activity of *L. infantum* amastigotes relative to the control. IC<sub>50</sub> values were calculated by nonlinear regression analysis of dose-response curves, using TableCurve 2D V5 software. IC<sub>50</sub> values represent the mean of three independent experiments.

#### Antitrypanosomal activity on *T. brucei brucei* trypomastigotes

Assays were performed on *T. brucei brucei* AnTat 1.9 strain (IMTA, Antwerp, Belgium). Trypanosomes were cultured in MEM containing Earle's salts, supplemented according to the protocol of Baltz et al.<sup>[32]</sup> with the following additions: mercaptoethanol (0.5 mM, Sigma-Aldrich, France), L-cysteine (1.5 mM, Sigma-Aldrich), bathocuproine disulfonate (0.05 mM, Sigma-Aldrich) and 20% heat-inactivated horse serum (Gibco, France), at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The parasites were incubated at an average density of 2000 parasites per well in sterile 96-wells plates (Mc2, France) with various concentrations of compounds dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich), in duplicate. Reference drugs suramin, eflornithine, and fexinidazole (purchased from Sigma-Aldrich, France and Fluorochem, UK) suspended in 0.9% NaCl or DMSO, were added to each set of experiments. The effects of the test compounds were assessed using the viability marker Alamar Blue assay described by R  z et al.<sup>[33]</sup> After a 69 h incubation period at 37 °C, Alamar Blue (10 µL, Fisher, France) was added to each well, and the plates were incubated for 5 h.<sup>[34]</sup> The plates were read using a PerkinElmer (Germany) ENSPIRE microplate reader using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. IC<sub>50</sub> values were calculated by nonlinear regression analysis of dose-response curves using GraphPad Prism software. IC<sub>50</sub> was defined as the concentration of drug required to inhibit by 50% the viability of *T. brucei brucei* relative to the control. IC<sub>50</sub> values were calculated from three independent experiments in duplicate.

#### Antitrypanosomal activity on *T. brucei* trypomastigotes overexpressing the nitroreductase NTR1

*Trypanosoma brucei* bloodstream-form "single marker" S427 (T7RPOL TETR NEO) and drug-resistant cell lines were cultured at 37 °C in HMI9-T medium<sup>[35]</sup> supplemented with G418 (2.5 µg mL<sup>-1</sup>,

Melford) to maintain expression of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor protein. Bloodstream trypanosomes overexpressing the *T. brucei* nitroreductase (NTR1)<sup>[36]</sup> were grown in medium supplemented with phleomycin (2.5 µg mL<sup>-1</sup>) and expression of NTR was induced by the addition of tetracycline (1 µg mL<sup>-1</sup>). Cultures were initiated with 1 × 10<sup>5</sup> cells per mL and sub-cultured if the cell density approached 1 × 10<sup>6</sup>–2 × 10<sup>6</sup> cells per mL. To examine the effects of inhibitors on the growth of these parasites, triplicate cultures containing the inhibitor were seeded at 1 × 10<sup>5</sup> trypanosomes per mL. Cells overexpressing NTR were induced with tetracycline 48 h prior to EC<sub>50</sub> analysis. Cell densities were determined after culture for 72 h, as previously described.<sup>[37]</sup> EC<sub>50</sub> values were determined using the following two-parameter equation by nonlinear regression using GraFit [Eq. (1)]:

$$y = \frac{100}{1 + \left( \frac{[I]}{EC_{50}} \right)^m} \quad (1)$$

The experimental data were corrected for background cell density and expressed as a percentage of the uninhibited control cell density. In this equation, [I] represents inhibitor concentration and *m* is the slope factor.

#### Cytotoxicity evaluation on HepG2 cells

The evaluation of the cytotoxicity of the test molecules on HepG2 cells (hepatocarcinoma cell line from ECACC purchased from Sigma-Aldrich, ref. 85011430-1VL, certificated without mycoplasma) was performed according to the method of Mosmann with slight modifications.<sup>[38]</sup> In brief, cells (1 × 10<sup>5</sup> cells per mL) in complete medium [100 µL, Alpha MEM Eagle from PAN BIOTECH supplemented with 10% foetal bovine serum, L-glutamine (2 mM) and antibiotics (100 U mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin)] were seeded into each well of 96-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After a 24 h incubation, medium (100 µL) with various product concentrations and appropriate controls was added and the plates were incubated for 72 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Each well was then examined by microscope for possible precipitate formation before the medium was aspirated from the wells. MTT solution (100 µL, 0.5 mg mL<sup>-1</sup> in Alpha MEM Eagle) was then added to each well. Cells were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After this time, the MTT solution was removed and DMSO (100 µL) was added to dissolve the resulting formazan crystals. Plates were shaken vigorously (300 rpm) for 5 min. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer (Eon BioTek). DMSO was used as a blank and doxorubicin (Sigma-Aldrich) as a positive control. CC<sub>50</sub> values were calculated by nonlinear regression analysis of dose-response curves using TableCurve 2D V5 software. CC<sub>50</sub> values represent the mean value calculated from three independent experiments.

#### Acknowledgements

The authors thank the Universit   Paul Sabatier de Toulouse and the R  gion Occitanie/Pyr  n  es-M  diterran  e for funding this work. A.H.F. and S.W. are supported by funding from the Wellcome Trust (WT105021). Christian Bijani from the NMR facility Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, Catherine Claparols, Nathalie Martins-Froment, Val  rie Bourdon, and Eric Leroy from the mass spectrometry service of Institut de Chimie de



Toulouse are also acknowledged for their support of NMR and HRMS experiments, respectively.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** 8-nitroquinolin-2(1H)-ones • antikinetoplastid pharmacomodulation • palladium-catalysed cross-coupling • parasitic nitroreductases • trypanosomatids

- [1] P. Capewell, N. J. Veitch, C. M. Turner, C. M. R. Turner, J. Raper, M. Berriman, S. L. Hadjuk, A. MacLeod, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1287.
- [2] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, *Lancet* **2017**, *390*, 2397–2405.
- [3] D. Pace, *J. Infect.* **2014**, *69*, S10–S18.
- [4] a) M. M. Ashkan, K. M. Rahim, *Trop. Doct.* **2008**, *38*, 186–188; b) *Neglected Tropical Diseases*, World Health Organization: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) (accessed September 7, 2018).
- [5] *Leishmaniasis*, WHO Fact Sheet, World Health Organization: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, updated March 14, 2018.
- [6] *Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)*, WHO Fact Sheet, World Health Organization: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)), updated February 16, 2018.
- [7] M. C. Field, D. Horn, A. H. Fairlamb, M. A. J. Ferguson, D. W. Gray, K. D. Read, M. De Rycker, L. S. Torrie, P. G. Wyatt, S. Wyllie, I. H. Gilbert, *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 217–231.
- [8] G. Eperon, M. Balasegaram, J. Potet, C. Mowbray, O. Valverde, F. Chapuis, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1407–1417.
- [9] B. Zulfiqar, T. B. Shelper, V. M. Avery, *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 1516–1531.
- [10] S. Patterson, A. H. Fairlamb, *Curr. Med. Chem.* **2018**, DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867325666180426164352>.
- [11] R. T. Jacobs, B. Nare, S. A. Wring, M. D. Orr, D. Chen, J. M. Sligar, M. X. Jenks, R. A. Noe, T. S. Bowling, L. T. Mercer, C. Rewerts, E. Gaukel, J. Owens, R. Parham, R. Randolph, B. Beaudet, C. J. Bacchi, N. Yarlett, J. J. Plattner, Y. Freund, C. Ding, T. Akama, Y. K. Zhang, R. Brun, M. Kaiser, I. Scandale, R. Don, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1151.
- [12] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F. R. C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K. D. Read, A. H. Fairlamb, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, e119.
- [13] V. K. B. K. Mesu, W. M. Kalonji, C. Bardonneau, O. V. Mordt, S. Blesson, F. Simon, S. Delhomme, S. Bernhard, W. Kuziena, J. F. Lubaki, S. L. Vuvu, P. N. Ngima, H. M. Mbembo, M. Ilunga, A. K. Bonama, J. A. Heradi, J. L. L. Salomo, G. Mandula, L. K. Badibabi, F. R. Dama, P. K. Lukula, D. N. Tete, C. Lumbala, B. Scherrer, N. Strub-Wourgaft, A. Tarral, *Lancet* **2018**, *391*, 144–154.
- [14] S. Patterson, S. Wyllie, *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 289–298.
- [15] S. Wyllie, S. Patterson, A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 901–906.
- [16] S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B. Foth, M. Berriman, K. Read, A. H. Fairlamb, *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005971/22.
- [17] B. S. Hall, X. Wu, L. Hu, S. R. Wilkinson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1193–1199.
- [18] P. Verhaeghe, P. Rathelot, S. Rault, P. Vanelle, *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 891–897.
- [19] L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Castera-Ducros, A. Dumètre, L. Mbatchi, S. Hutter, M. Kraiem-M'Rabet, M. Laget, V. Remusat, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 75–86.
- [20] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, V. Remusat, M. Kraiem-M'Rabet, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 282–294.
- [21] C. Kieffer, A. Cohen, P. Verhaeghe, L. Paloque, S. Hutter, C. Castera-Ducros, M. Laget, S. Rault, A. Valentin, P. Rathelot, N. Azas, P. Vanelle, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2377–2386.
- [22] J. Pedron, C. Boudot, S. Hutter, S. Bourgeade-Delmas, J.-L. Stigliani, A. Sournia-Saquet, A. Moreau, E. Boutet-Robinet, L. Paloque, E. Mothes, M. Laget, L. Vendier, G. Pratiel, S. Wyllie, A. H. Fairlamb, N. Azas, B. Courtioux, A. Valentin, P. Verhaeghe, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 135–152.
- [23] V. P. Andreev, Y. P. Nizhnik, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 137–138.
- [24] N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson, L. W. Deady, B. M. Abbott, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3781–3790.
- [25] M. S. Tremblay, M. Halim, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7570–7577.
- [26] E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6002–6005.
- [27] S. D. Kuduk, J. W. Skudlarek, C. N. Di Marco, J. G. Bruno, M. A. Pausch, J. A. O'Brien, T. D. Cabalu, J. Stevens, J. Brunner, P. L. Tannenbaum, A. L. Gotter, C. J. Winrow, J. J. Renger, P. J. Coleman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1784–1789.
- [28] R. Zhou, W. Wang, Z.-j. Jiang, K. Wang, X.-l. Zheng, H.-y. Fu, H. Chen, R.-x. Li, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6023–6026.
- [29] H. Van de Poël, G. Guillaumet, M. C. Viaux-Massuard, *Heterocycles* **2002**, *57*, 55–71.
- [30] O. A. Volkov, C. C. Cosner, A. J. Brockway, M. Kramer, M. Booker, S. Zhong, A. Ketcherside, S. Wei, J. Longgood, M. K. McCoy, T. E. Richardson, S. A. Wring, M. Peel, J. D. Klinger, B. A. Posner, J. K. De Brabander, M. A. Phillips, *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 512–526.
- [31] C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A. F. Alvarez, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1635–1643.
- [32] T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1273–1277.
- [33] B. Ráz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, *Acta. Trop.* **1997**, *68*, 139–147.
- [34] J. Guillon, A. Cohen, R. N. Das, C. Boudot, N. M. Gueddouda, S. Moreau, L. Ronga, S. Savrimoutou, L. Basmaciyan, C. Tisnerat, S. Mestaniér, S. Rubio, S. Amaziane, A. Dassonville-Klimpt, N. Azas, B. Courtioux, J.-L. Mergny, C. Mullié, P. Sonnet, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 974–995.
- [35] N. Greig, S. Wyllie, S. Patterson, A. H. Fairlamb, *FEBS J.* **2009**, *276*, 376–386.
- [36] S. Wyllie, B. J. Foth, A. Kelner, A. Y. Sokolova, M. Berriman, A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *71*, 625–634.
- [37] D. C. Jones, I. Hallyburton, L. Stojanovski, K. D. Read, J. A. Frearson, A. H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 1478–1486.
- [38] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

Manuscript received: July 8, 2018

Revised manuscript received: August 29, 2018

Version of record online: September 17, 2018

## CHAPITRE 5

# Étude de pharmacomodulation anti-kinétoplastidés en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

## Chapitre 5 : Étude de pharmacomodulation anti-kinétoplastidés en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

### 1. Introduction

L'étude du pharmacophore présentée lors des chapitres précédents a notamment permis d'identifier que la substitution de la position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one permet l'obtention de molécules particulièrement actives sur *Trypanosoma brucei brucei*, telles que la 6-nitroquinoléin-2(1H)-one **17** et la 6-méthyl-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **31**. Un travail de pharmacochimie en position 6 a donc été entrepris, cette position semblant présenter un intérêt particulier dans le développement de molécules anti-*Trypanosoma*. Au cours de cette étude, nous avons choisi d'introduire des substituants électroattracteurs tels que le groupement trifluorométhyle ou des atomes d'halogènes, afin notamment d'augmenter la réductibilité du groupement nitro et faciliter sa bioactivation par les nitroréductases parasitaires. Par ailleurs, afin d'augmenter la puissance d'action antiparasitaire des molécules de cette série, des dérivés substitués en position 6 par des groupements électroattracteurs et en position 3 par les meilleurs groupements identifiés lors des travaux précédents ont été synthétisés.

Dans un premier temps, des travaux de synthèse organique ont été réalisés menant à la préparation de 19 molécules dont 18 sont originales. La préparation de 10 dérivés substitués en position 6 du pharmacophore par un groupement trifluorométhyle a été effectuée à partir de la *p*-trifluorométhylaniline, le noyau quinoléin-2(1H)-one étant formé *via* une réaction de cyclocondensation. Par ailleurs, une mise au point des réactions d'halogénéation sélective et de dihalogénéation (en positions 3 et 6) de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22**, a été réalisée et a permis la préparation de 5 molécules. Enfin, à la suite de la synthèse d'un dérivé 3,6-dibromé, l'optimisation de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura a conduit à la préparation de 4 nouvelles molécules, monocouplées ou dicouplées. Une étude électrochimique a également été effectuée afin d'étudier l'influence de la substitution de la position 6 du pharmacophore sur les potentiels de réduction.

Dans un second temps, la cytotoxicité des 19 molécules synthétisées a été évaluée sur la lignée humaine HepG2 et leur activité antiparasitaire a été mesurée sur la forme amastigote axénique de *L. infantum* et la forme trypomastigote de *T. brucei brucei*. A la suite de cette évaluation biologique, deux nouveaux hits anti-*Trypanosoma* ont été identifiés. Afin de compléter l'étude des propriétés *in vitro* de ces deux agents anti-*Trypanosoma*, des analyses supplémentaires ont été réalisées incluant la recherche du mécanisme d'action, l'évaluation de la génotoxicité ainsi que la détermination de paramètres pharmacocinétiques *in vitro* de ces composés.

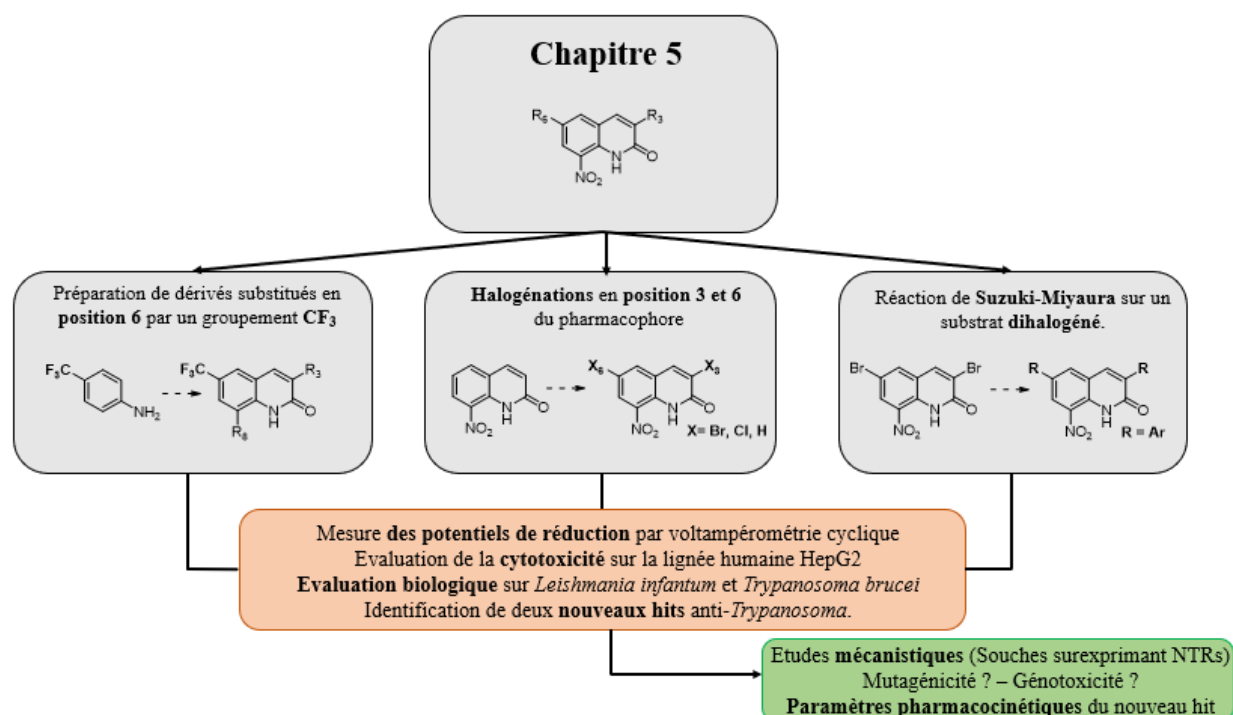


Figure 95 : Résumé des objectifs pharmacochimiques du chapitre 5.

## 2. Travaux de synthèse.

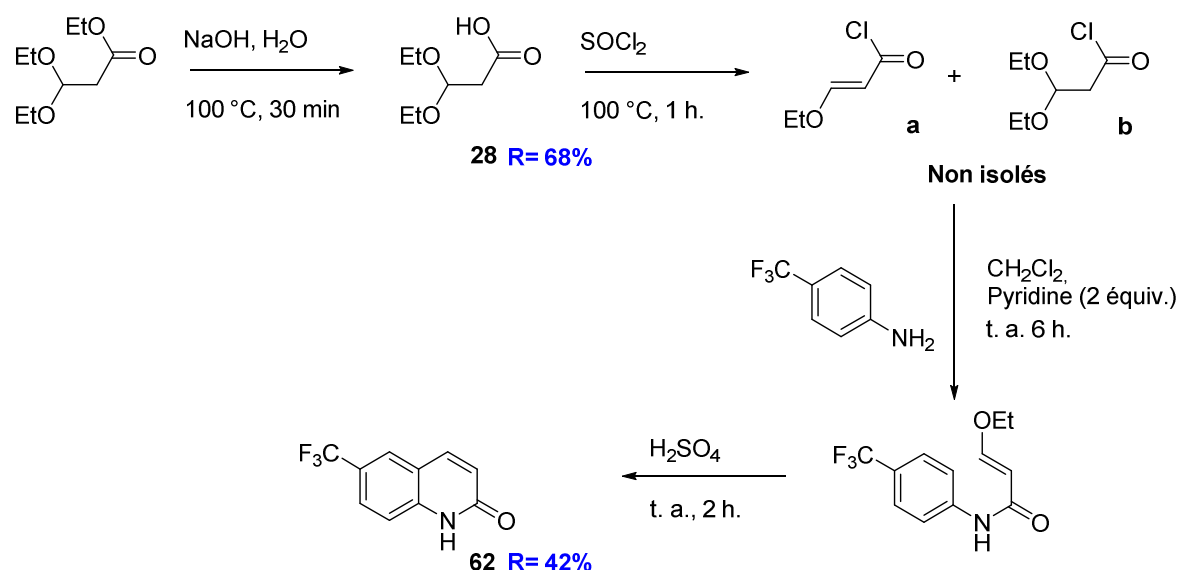
### 2.1. Préparation de dérivés trifluorométhylés en position 6.

Notre objectif est tout d'abord d'étudier l'influence du groupement trifluorométhyle en position 6 du pharmacophore sur l'activité antiparasitaire. Afin d'introduire ce substituant sur la partie benzénique de la quinoléin-2(1H)-one, nous avons suivi une voie de synthèse multi-étapes à partir de la *p*-trifluorométhylaniline, séquence réactionnelle auparavant abordée dans le chapitre 3 (page 106).<sup>344</sup> Ainsi, 10 dérivés ont été obtenus *via* des réactions successives de nitration, d'halogénéation et de méthylation.

#### 2.1.1. Synthèse de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one

Nous avons choisi de suivre le protocole décrit par Zaragoza qui permet de préparer la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one à partir du 3,3'-diéthoxypropionate d'éthyle.<sup>344</sup> Après une première étape de saponification en milieu basique, l'acide 3,3'-diéthoxypropionique **28** a été converti en chlorure d'acyle par réaction avec le chlorure de thionyle. Le mélange de chlorures d'acyle **a** et **b** a été directement engagé dans une troisième étape, une réaction de *N*-acylation de la *p*-trifluorométhylaniline formant un intermédiaire de type acrylamide, que nous n'avons pas isolé. Enfin, une dernière étape de cyclocondensation dans de l'acide sulfurique à 98 % a permis d'obtenir la molécule **62** avec un rendement de 42 %, calculé par rapport à la quantité de matière de *p*-trifluorométhylaniline engagée dans la troisième étape.

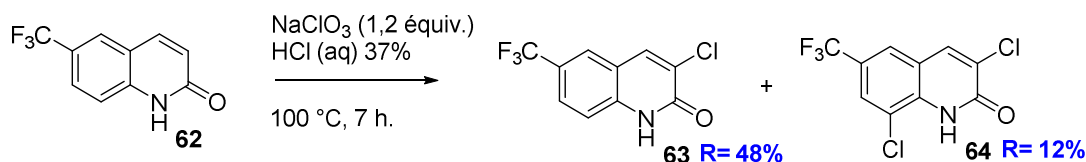
<sup>344</sup> F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 306-311



## 2.1.2. Fonctionnalisation de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

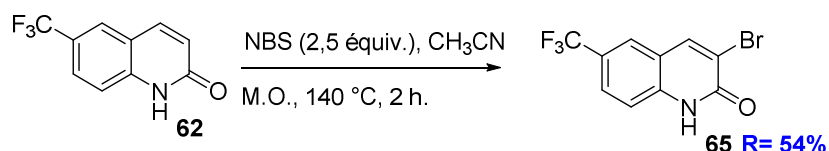
### 2.1.2.1. Synthèse de la 3-chloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

Afin d'halogéner sélectivement la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one, nous avons adapté le protocole décrit par O'Brien<sup>339</sup> en utilisant du chlorate de sodium (NaClO<sub>3</sub>) dans de l'acide chlorhydrique à reflux. La 3-chloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **63** et la 3,8-dichloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **64** ont ainsi été isolées avec des rendements respectifs de 48 % et 12 %.



### 2.1.2.2. Préparation de la 3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

La 3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **65** a été synthétisée selon un protocole adapté de Glasnov en série 4-arylquinoléin-2(1H)-one, utilisant du *N*-bromosuccinimide, de l'acétonitrile et un chauffage au micro-ondes.<sup>393</sup> La molécule **65** a ainsi été obtenue avec un rendement de 54 %.



<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

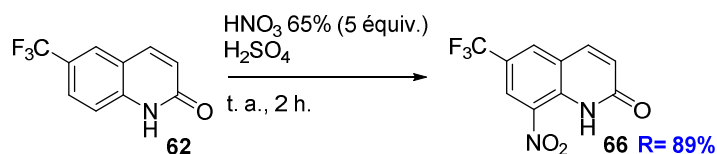
<sup>393</sup> T. N. Glasnov, W. Stadlbauer, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3864-3870.



### 2.1.3 Synthèse de dérivés de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

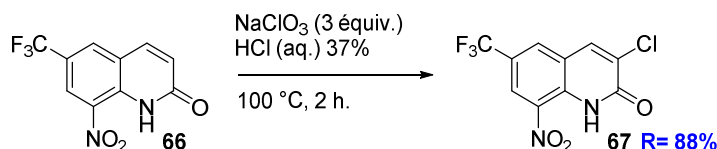
#### 2.1.3.1 Nitration de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

La réaction de nitration de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **62** a été effectuée dans un mélange sulfonitrique à température ambiante, selon un protocole déjà décrit.<sup>328</sup> La 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **66** a ainsi été isolée avec un rendement de 89 %. La réactivité de la position 8 est à rapprocher de la présence du groupement trifluorométhyle, électroattracteur par effet inductif et désactivant, qui va orienter la substitution électrophile sur aromatique en position *meta*.



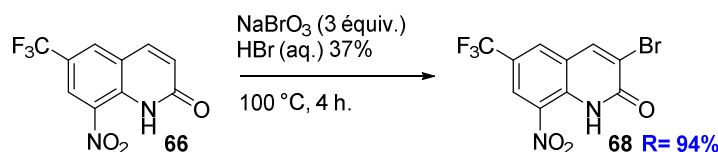
#### 2.1.3.2 Synthèse de la 3-chloro-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

L'halogénéation de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **66** a été réalisée selon le même protocole que celui décrit pour la molécule **63**, utilisant du chlorate de sodium dans de l'acide chlorhydrique chauffé à reflux. Contrairement au composé **62**, la position 8 de la molécule **66** est substituée par un groupement nitro : un excès de chlorate de sodium a ainsi pu être utilisé sans le risque de former des sous-produits halogénés à la fois en position 3 et 8. La 3-chloro-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **67** a ainsi été synthétisée avec un rendement de 88 %



#### 2.1.3.3 Préparation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

Afin d'obtenir le dérivé bromé en C3, nous avons appliqué un protocole analogue à celui de la réaction de chloration en position 3 de la molécule **66**, utilisant du bromate de sodium dans de l'acide bromhydrique à reflux. La molécule **68** a ainsi été obtenue avec un rendement de 94 %.

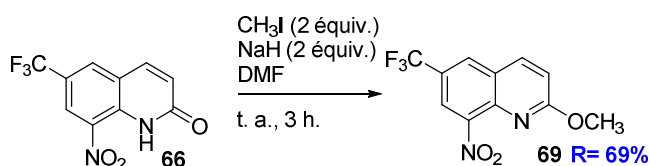


<sup>328</sup> F. Misani et N. T. Bogert, *J. Org. Chem.*, **1945**, 10, 458-463.

### 2.1.3.4 Méthylation de dérivés de 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

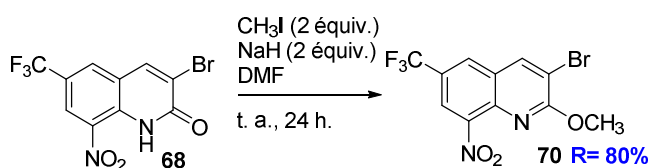
#### 2.1.3.4.1 Méthylation de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

La molécule **66** a été méthylée selon un protocole adapté de M. Naik,<sup>338</sup> utilisant l'iodure de méthyle, l'hydrure de sodium et le DMF. Ce protocole a par ailleurs déjà été utilisé pour la réaction de méthylation des molécules **22**, **24** et **56**. La molécule **69** a été obtenue avec un rendement de 69 % grâce à ces conditions réactionnelles. La RMN <sup>13</sup>C a permis d'identifier le produit de *O*-méthylation *via* l'observation du déplacement chimique de l'atome de carbone du groupement méthyle, ici de 54,5 Hertz. Pour rappel, le déplacement chimique de l'atome de carbone d'un groupement méthyle inclus dans un motif (CO)-N(R)-CH<sub>3</sub> est d'environ 35 ppm tandis qu'il est d'environ 55 ppm pour un motif Ar-OCH<sub>3</sub>.<sup>337</sup>



#### 2.1.3.4.2 Méthylation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

La 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one a également été engagée dans une réaction de méthylation selon la même procédure que celle qui a été utilisée pour la synthèse de la molécule **69**. Après 24 h à température ambiante, le composé **70** a été isolé avec un rendement de 80%. La RMN <sup>13</sup>C a permis d'identifier le produit de *O*-méthylation par l'observation du déplacement chimique de l'atome de carbone du groupement méthyle à 55,3 ppm.



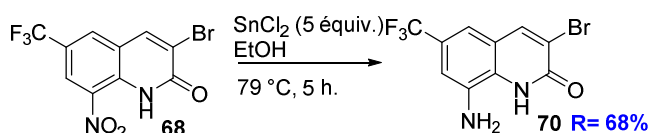
### 2.1.4 Réduction de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one.

Afin de s'assurer de l'importance du groupement nitro dans l'activité anti-kinétoplastidés des molécules de cette série, la molécule **68** a été réduite selon un protocole utilisant du chlorure d'étain (II) dans de l'éthanol chauffé à reflux. Le dérivé aminé **71** a finalement été isolé avec un rendement de 68 %.

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5419-5434.

<sup>337</sup> <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/c13-data/cdata.htm>, consulté le 25/07/2018.



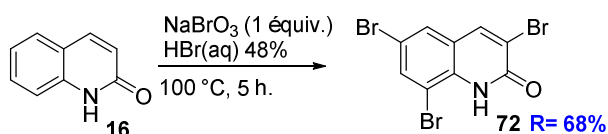


## 2.2. Halogénations en position 3 et 6 du pharmacophore.

Dans le but de poursuivre les études de RSA en position 6 du pharmacophore et d'augmenter la réductibilité du groupement nitro, nous avons choisi de synthétiser des dérivés substitués en cette position par des atomes d'halogènes. De plus, lors de travaux précédents, l'introduction d'un atome de brome ou de chlore en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22** avait mené à l'obtention de dérivés actifs sur *L. infantum* et *T. brucei brucei*. Une mise au point de la réaction d'halogénéation a donc été nécessaire afin de préparer des molécules substituées par un atome d'halogène en position 6 du pharmacophore et des dérivés dihalogénés en position 3 et 6.

### 2.2.1. Essais de bromation de la quinoléin-2-(1H)-one.

Afin, notamment, de compléter l'étude sur le rôle du groupement nitro dans l'activité antiparasitaire, la quinoléin-2-(1H)-one **16** a été engagée dans une réaction de bromation utilisant les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse de la molécule **68**.



Après 5 h de réaction, la molécule tribromée **72** a pu être séparée de différents isomères de position dibromés, qui n'ont pas été isolés. Deux autres essais ont été effectués en changeant la température de réaction et le nombre d'équivalents de bromate de sodium ajouté au cours de la réaction. Cependant, ni une réaction à température ambiante, ni un ajout de 0,5 équivalent de bromate de sodium, n'ont permis d'isoler un dérivé monohalogéné. Des essais supplémentaires pourraient être réalisés, notamment en refroidissant le milieu réactionnel à - 80 °C,<sup>394</sup> mais nous avons choisi de ne pas poursuivre la mise au point de cette réaction, menant à la préparation d'un contrôle négatif lors des évaluations antiparasitaires.

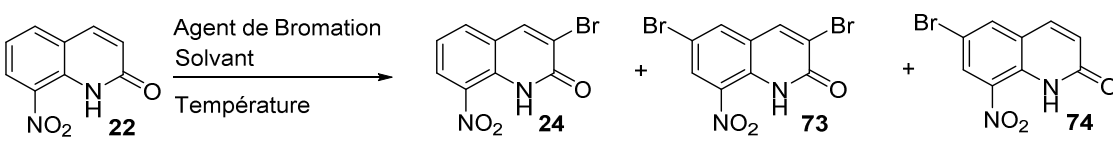
### 2.2.2. Bromation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

#### 2.2.2.1. Optimisation de la réaction.

Afin d'étudier l'influence de la présence d'un atome d'halogène en cette position sur l'activité antiparasitaire, nous avons donc tenté d'introduire un atome de brome de façon sélective en position 6 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22**. Cette réaction s'est avérée problématique et a nécessité un travail

<sup>394</sup> M. Fernandez, E. de la Cuesta, C. Avendano, *Synthesis*, **1995**, 11, 1362-1364

de mise au point portant sur l'agent de bromation, la nature du solvant, la température du milieu et la durée de réaction. Les principaux essais sont résumés dans le Tableau 34.



Réactif	Solvant	Température	Rdt <b>24</b> (%)	Rdt <b>73</b> (%)	Rdt <b>74</b> (%)
NaBrO <sub>3</sub> (3 équiv.)	HBr (aq) 48 %	100°C	<b>69</b>	10	0
NaBrO <sub>3</sub> (5 équiv.)	HBr (aq) 48 %	100°C	0	<b>57</b>	0
NBS (5 équiv.)	CH <sub>3</sub> CN	de t.a à reflux	Nombreux produits non isolés		
NBS (5 équiv.)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	de t.a à reflux	Pas de conversion		
NBS (5 équiv.)	DMF	de t.a à reflux	Pas de conversion		
Br <sub>2</sub> (4 équiv.)	CH <sub>3</sub> COOH	de t.a à reflux	Pas de conversion		
Br <sub>2</sub> (4 équiv.)	CH <sub>3</sub> COOH, + CH <sub>3</sub> COONa (anh.)	120°C	0	33	<b>9</b>

**Tableau 34** : Essais de bromation de la molécule **22**.

La bromation sélective en position 3 de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one **22** avait été présentée lors de travaux précédents (Chapitre 3, page 103). Selon un protocole adapté de O'Brien utilisant du bromate de sodium dans de l'acide bromhydrique à reflux, le composé **24** avait été obtenu avec un rendement de 69 %. En vue de synthétiser la molécule dibromée en position 3 et 6, ce même protocole a été appliqué avec une augmentation du nombre d'équivalents de bromate de sodium. Après 48 h à reflux, la molécule dihalogénée **73** a été synthétisée avec un rendement de 57%.

Avec l'objectif de synthétiser la 6-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one, plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier la nature de l'agent de bromation, la nature du solvant et la température de réaction. Les premiers essais ont été réalisés en adaptant un protocole de bromation décrit par Canibano en série pyridine.<sup>395</sup> Ainsi, lorsque la réaction a été réalisée dans le dichlorométhane ou dans le DMF, une absence de conversion a été constatée après 48 h de chauffage à reflux, lors du suivi par CCM. En employant de l'acétonitrile en tant que solvant, un mélange complexe de produits que nous n'avons pas isolé a été observé.

De nouveaux essais ont ensuite été réalisés en utilisant le dibrome comme agent halogénant, selon une procédure adaptée décrite par O. Tee en série pyridone<sup>396</sup> mais aucune progression de la réaction n'a été observée après 48 h de chauffage à reflux dans de l'acide acétique. Cependant, lorsque le milieu réactionnel a été saturé en acétate de sodium anhydre, deux produits ont été formés. Les molécules **73** et **74** ont finalement été isolées avec des rendements respectifs de 33 et 9 %.

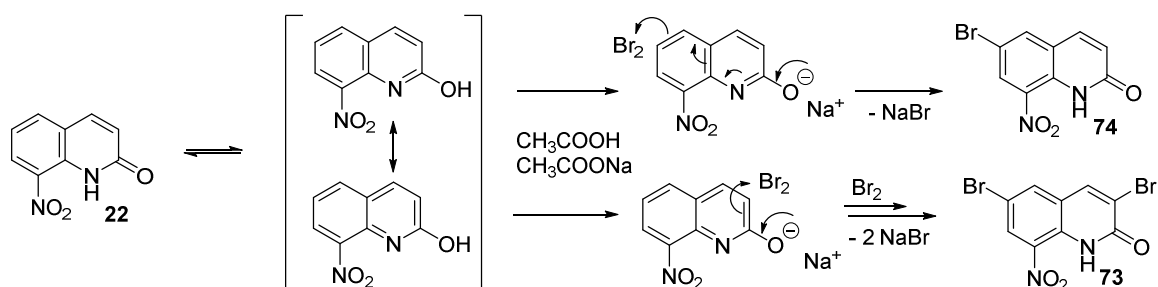
<sup>395</sup> V. Canibano, J. F. Rodriguez, M. Santos *et al.*, *Synthesis*, **2001**, 14, 2175-2179.

<sup>396</sup> O. S. Tee, M. Paventi, *JACS*, **1982**, 14, 4142-4146.

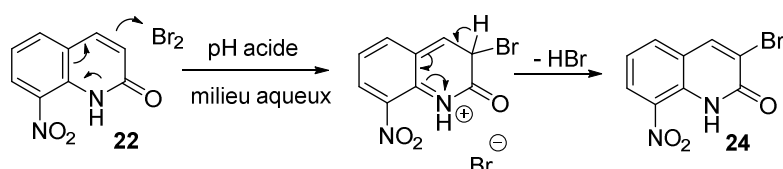
### 2.2.2.2. Mécanisme réactionnel postulé.

Ainsi, deux protocoles ont permis la conversion du substrat en produits substitués par un atome de brome en position 3 et/ou en position 6 du pharmacophore : un protocole utilisant le dibrome dans l'acide acétique chauffé au reflux, saturé en acétate de sodium<sup>393</sup> et un protocole utilisant le bromate de sodium dans l'acide bromhydrique.<sup>339</sup> La caractérisation de ces produits de bromation montre que le substrat **22** présente, vis-à-vis du dibrome (introduit tel quel ou généré *in situ* par action de l'acide bromhydrique sur le bromate de sodium), un comportement différent selon la nature du solvant et le pH du milieu.

- 1) Un milieu organique (acide acétique), contenant une base (acétate de sodium) et porté à une température élevée (120 °C) semble favoriser la réaction de substitution électrophile sur aromatique à partir de la forme tautomère lactime, par enrichissement en électrons du cycle aromatique suite à l'action de la base. Ceci conduit à deux molécules bromées en position 6 : la 3,6-dibromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **73** et la 6-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **74**.



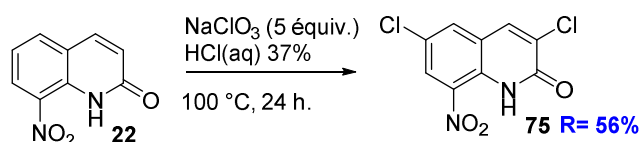
- 2) A l'inverse, un milieu aqueux acide s'avère très favorable à la monobromation en position 3, le substrat **22** se comportant alors vis-à-vis du dibrome comme une pyridone, le noyau 8-nitroquinoléin-2(1H)-one étant trop fortement désactivé par le groupement nitro pour conduire à des produits de S<sub>E</sub>Ar. Ces résultats sont conformes aux données présentes dans la littérature.<sup>393</sup> La 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** est ainsi isolée avec un rendement satisfaisant de 69 %.



<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

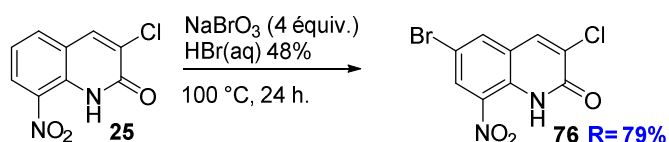
### 2.2.3. Préparation de la 3,6-dichloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Lors des études de RSA réalisées en position 3 du pharmacophore, la substitution de l'atome d'hydrogène par un atome de brome ou par un atome de chlore avait mené à deux des dérivés les plus actifs de cette série sur *L. infantum* et *T. brucei brucei* (molécules **24** et **25**). Ainsi, notre objectif est de continuer l'exploration de la position 6 du noyau tout en fonctionnalisant la position 3 par les meilleurs groupements identifiés lors des travaux précédents. Pour cela, des molécules dihalogénées en position 3 et 6 du pharmacophore ont été synthétisées. La 3,6-dichloroquinoléin-2(1H)-one a été préparée selon un protocole analogue à celui qui avait permis la préparation de son analogue dibromé **73**, utilisant un large excès de chlorate de sodium dans de l'acide chlorhydrique chauffé à reflux. La molécule **75** a ainsi été obtenue avec un rendement de 56 %.

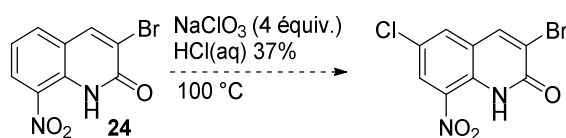


### 2.2.4. Préparation de la 6-bromo-3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

Notre objectif a ensuite été de préparer des molécules substituées en position 3 et 6 du pharmacophore par des atomes d'halogènes différents. Pour cela, la 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **25** a été engagée dans un protocole de bromation utilisant un large excès de bromate de sodium dans de l'acide bromhydrique. Après 24 h à reflux, le dérivé dihalogéné **76** a été isolé avec un rendement de 79 %.



Par ailleurs, la synthèse de la molécule substituée par un atome de chlore en position 6 et par un atome de brome en position 3 est en cours à partir de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one, *via* un protocole de chloration analogue au précédent, utilisant un excès de chlorate de sodium.

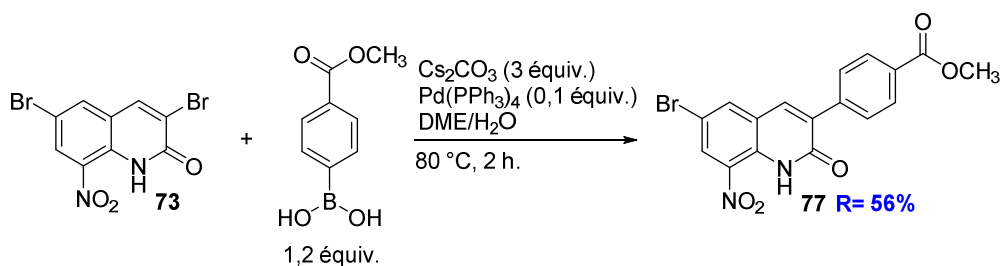


### 2.3. Couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura sur la 3,6-dibromoquinoléin-2(1H)-one.

Lors des travaux de pharmacomodulation en position 3 de ce noyau, l'introduction d'un groupement *para*-carboxyphényle *via* un couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura avait permis d'identifier une molécule hit sélective de *Trypanosoma brucei brucei* (molécule **56**). En vue de poursuivre les travaux de RSA en position 6, nous avons voulu synthétiser un dérivé substitué en position 6 par un atome d'halogène et en position 3 par ce groupement *p*-carboxyphényle. De plus, la molécule **56** ne passe pas la barrière hémato-encéphalique lors du test de perméabilité PAMPA, ce qui limite son intérêt en tant qu'agent anti-*Trypanosoma* : l'introduction d'un atome de brome, volumineux et augmentant la lipophilie, pourrait ainsi permettre d'améliorer ce paramètre pharmacocinétique. Pour cela, une réaction de Suzuki-Miyaura sur la 3,6-dibromoquinoléin-2(1H)-one a été réalisée.

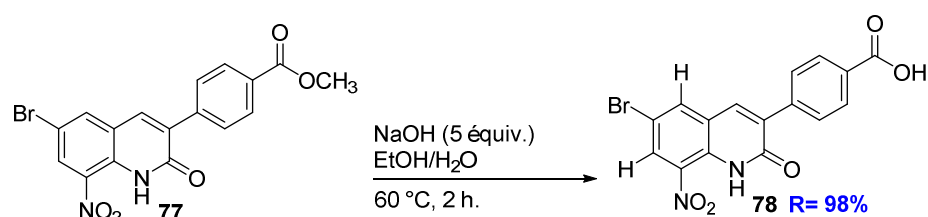
#### 2.3.1. Réaction de monocouplage de Suzuki-Miyaura en position 3.

Lors de l'optimisation de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura entre la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **24** et l'acide *p*-carboxyméthylphénylboronique, les meilleures conditions identifiées incluaient du carbonate de césium comme base, du Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> comme catalyseur palladié et du diméthoxyéthane en tant que solvant. Ces conditions de réaction ont été appliquées au couplage entre la molécule dibromée **73** et l'acide *p*-carboxyméthylphénylboronique, le solvant ayant simplement été remplacé par un mélange diméthoxyéthane/eau (80/20) comme solvant pour permettre une meilleure solubilisation des réactifs. Le milieu réactionnel a été chauffé à 80 °C pour limiter le risque de dicouplage. La molécule **77** a ainsi été obtenue avec un rendement de 56 %.



#### 2.3.2. Déprotection de la 6-bromo-3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one.

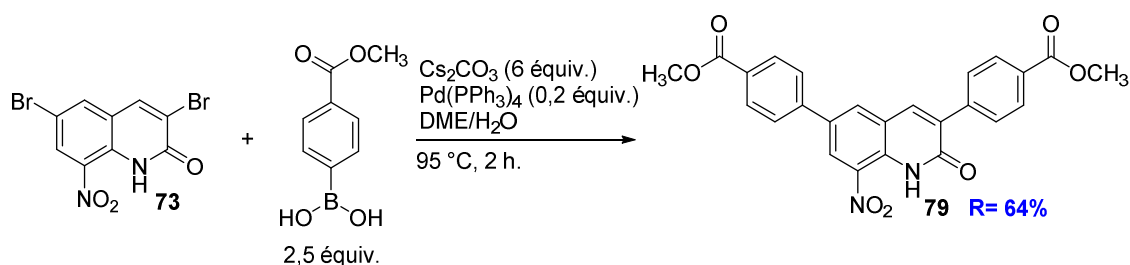
La déprotection de la molécule **77** a été réalisée *via* une réaction de saponification dans un mélange éthanol/eau (80/20) en présence d'un large excès de soude. La molécule **78** a ainsi été synthétisée avec un rendement quasiment quantitatif de 98 %.



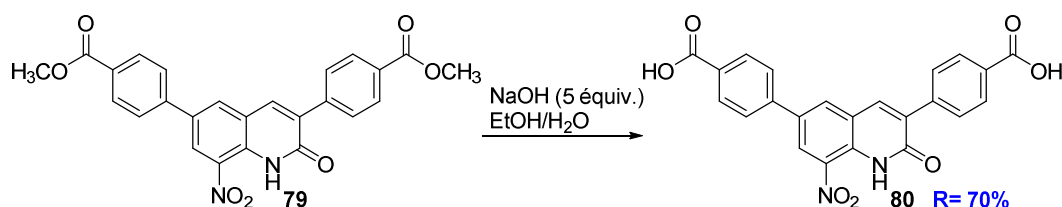
La sélectivité du couplage pour la position 3 a pu être confirmée par RMN 2D : les signaux de l'atome de carbone C<sub>6</sub> lié à un atome de brome couplent avec le signal de deux atomes d'hydrogène. En effet, si le couplage s'était réalisé en position 6, le signal de l'atome de carbone C<sub>3</sub> lié à un atome de brome n'aurait couplé qu'avec le signal d'un seul atome d'hydrogène.

### 2.3.3. Réaction de dicouplage de Suzuki-Miyaura en position 3 et 6.

Si la molécule **73** a permis la synthèse du dérivé monocouplé en position 3 du pharmacophore, cette dernière permet également l'introduction de deux groupements aryle sur le cycle nitroquinoléin-2(1*H*)-one, en position 3 et 6, *via* un dicouplage pallado-catalysé. Pour cela, nous avons appliqué les mêmes conditions réactionnelles que lors du monocouplage mais en doublant les quantités de base, de catalyseur au palladium et d'acide *p*-carboxyméthylphénylboronique. La molécule dicouplée **79** a ainsi été obtenue avec un rendement de 64 %.



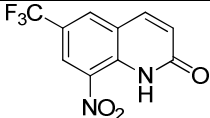
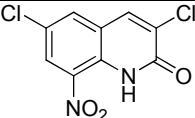
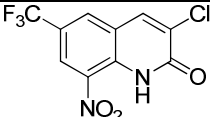
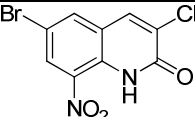
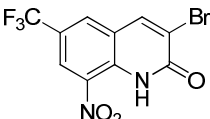
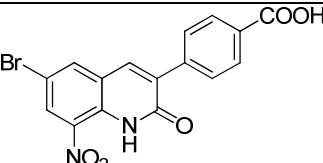
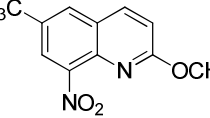
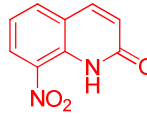
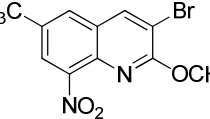
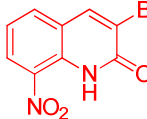
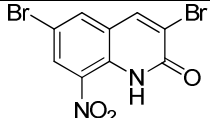
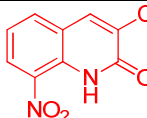
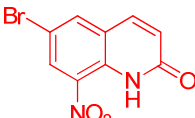
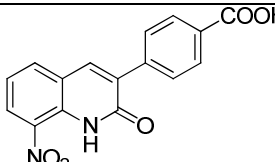
La déprotection du dérivé dicouplé **79** a ensuite été réalisée dans un mélange éthanol/eau (80/20) en présence de 5 équivalents de soude. La molécule **80** a finalement été synthétisée avec un rendement de 70 %.



Ainsi, cette nouvelle méthodologie de synthèse ouvre la voie à la préparation de nouvelles séries de molécules *via* des dicouplages symétriques de Suzuki-Miyaura comme pour la molécule **80**. L'introduction de deux groupements aryles différents lors de deux couplages de Suzuki-Miyaura successifs est également envisageable et ouvre la porte à un nouveau travail de pharmacochimie.

## 2.4. Étude électrochimique

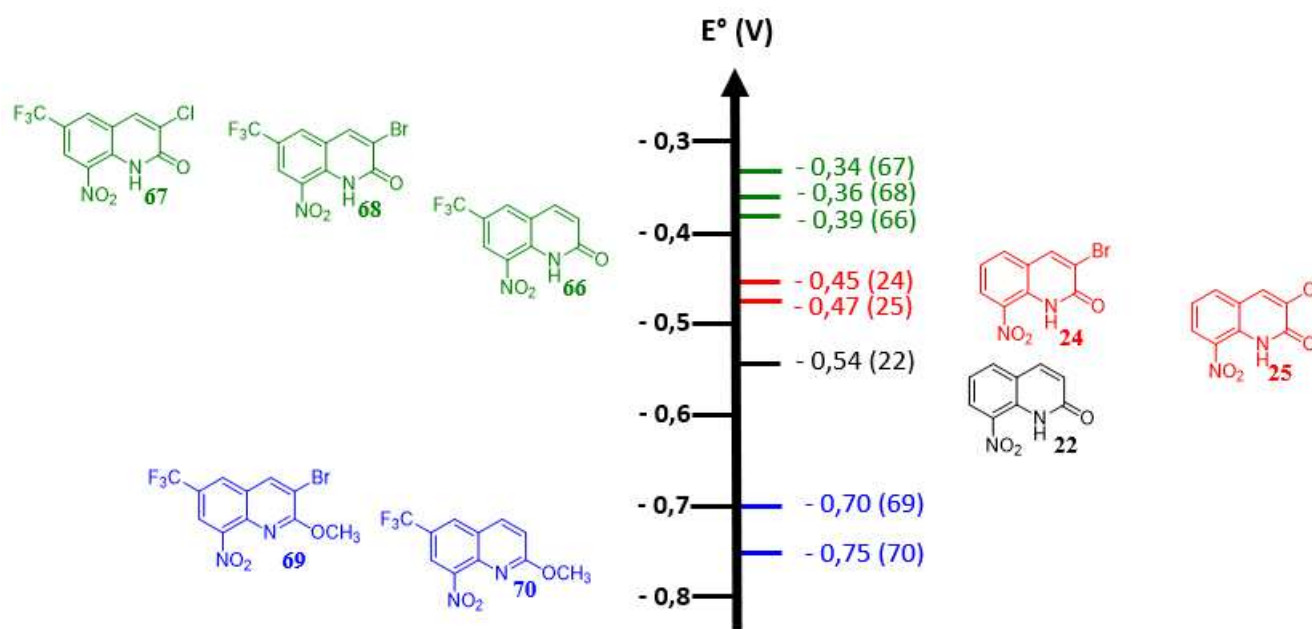
Afin de poursuivre l'étude du pharmacophore en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one, la mesure du potentiel de réduction du groupement nitro porté par ces nouveaux dérivés a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans les chapitres précédents. L'objectif est d'étudier l'effet de l'introduction d'un groupement électroattracteur en position 6 du pharmacophore sur les potentiels de réduction correspondant au couple  $\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\bullet-}$ . Les résultats sont présentés dans le tableau 35.

N°	Structure	E° (V/ENH)	N°	Structure	E° (V/ENH)
66		- 0,39	75		- 0,37
67		- 0,34	76		- 0,37
68		- 0,36	78		- 0,40
69		- 0,75	22		- 0,54
70		- 0,70	24		- 0,45
73		- 0,37	25		- 0,47
74		- 0,40	56		- 0,56

**Tableau 35 :** Structures et potentiels de réductions des molécules synthétisées mesurés par voltampérométrie cyclique (DMSO/TBAPF<sub>6</sub>, ECS/CV, couple rédox  $\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\bullet-}$ ). En rouge sont représentées les molécules synthétisées lors des travaux de RSA précédents.



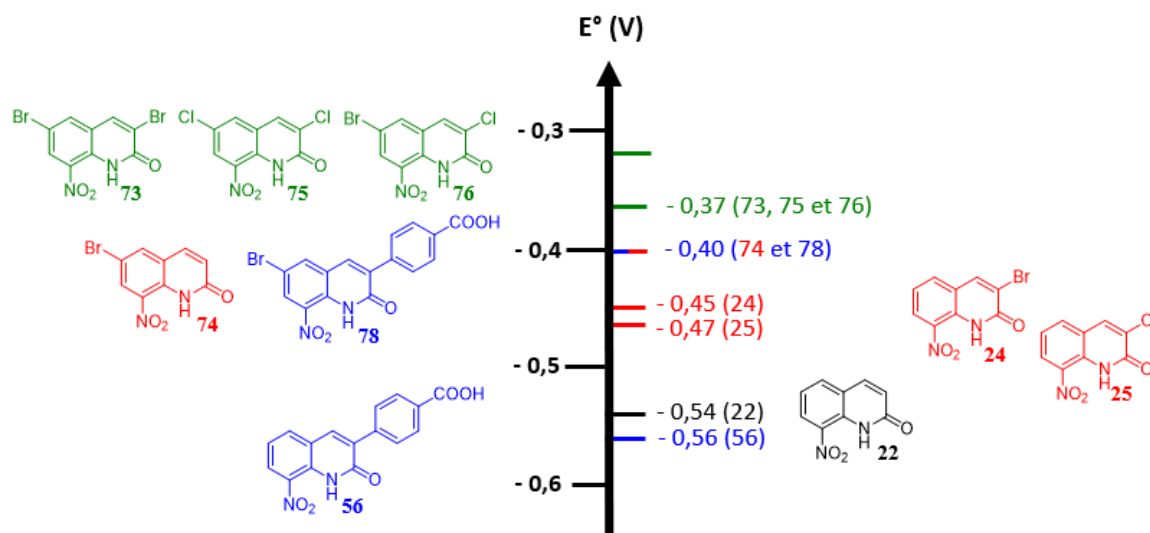
Le potentiel de réduction des nouvelles molécules synthétisées varie entre  $-0,34$  et  $-0,75$  V. Lors de l'étude électrochimique réalisée au cours du chapitre 3, nous avons observé que l'introduction d'un atome d'halogène en position 3 (molécules **24** et **25**) du pharmacophore avait tendance à appauvrir le cycle en électrons et provoquait une élévation des potentiels de réduction de  $0,1$  V par rapport à celui de la molécule non substituée **22**. Ainsi, les résultats présentés dans la Figure 96 indiquent que l'introduction d'un groupement trifluorométhyle (inductif attracteur pur) en position 6 (molécule **66**) du pharmacophore induit une augmentation de  $0,15$  V par rapport à celui du composé **22**. Lorsqu'en plus du groupement trifluorométhyle en position 6 du noyau, un atome d'halogène est introduit en position 3, les potentiels de réduction sont légèrement augmentés, de  $0,03$  V (molécule **68**) et de  $0,05$  V (molécule **67**), indiquant un effet électronique plus important de la substitution sur la partie benzénique plutôt que de celle sur la partie pyridone. En effet, les molécules halogénées en position 3 par un atome de brome (molécule **24**) et par un atome de chlore (**25**) ont des potentiels de réduction plus bas de respectivement  $0,09$  et  $1,3$  V en comparaison avec leurs analogues substitués en position 6 par un groupement trifluorométhyle (molécules **68** et **67**). Enfin, lorsque le motif lactame des molécules **66** et **68** est supprimé par *O*-méthylation, le potentiel de réduction diminue significativement de  $-0,35$  V (molécules **69** et **70**), ce qui confirme les résultats obtenus dans le chapitre 3 indiquant que la liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'azote du motif lactame et l'atome d'oxygène du groupement nitro appauvrit le cycle en électrons, rendant les dérivés de cette série plus facilement réductibles.



**Figure 96 :** Étude de l'effet de l'introduction d'un groupement trifluorométhyle en position 6 du pharmacophore sur les potentiels de réduction.

Par ailleurs, l'introduction d'un atome d'halogène en position 6 de ce pharmacophore a également plus d'effet sur le potentiel de réduction que lorsqu'elle est réalisée en position 3 avec une valeur de - 0,40 V pour la molécule **74** contre - 0,45 V la molécule **24** (Figure 97). En effet, les molécules dihalogénées **73** et **75** ont des potentiels de réduction augmentés de respectivement 0,08 et 0,1 V en comparaison avec leurs analogues monohalogénés (**24** et **25**) en position 3. De plus, la substitution en position 3 du noyau de la molécule **74** par un atome de chlore (molécule **76**) ou un atome de brome (molécule **73**) induit une augmentation non significative de 0,03 V, peu importe la nature de l'halogène introduit. La nature de l'halogène ne semble donc pas avoir d'influence sur le potentiel de réduction des molécules de cette série, la molécule dibromée **73** et son analogue dichlorée **75** ayant la même valeur de potentiel de - 0,37 V.

Enfin, lors de l'étude électrochimique présentée dans le chapitre 4, nous avons observé le faible effet sur le potentiel de réduction de l'introduction d'un groupement aryle en position 3 (molécule **56**) en comparaison avec la molécule non substituée **22**. Lorsqu'un atome de brome est introduit en position 6 (molécule **78**) de la molécule **56**, le potentiel de réduction est augmenté significativement de 0,16 V, confirmant la forte influence électronique de la substitution de cette position par un groupement électroattracteur.

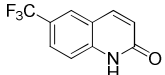
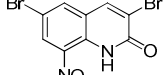
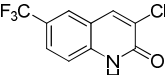
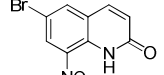
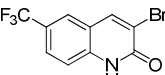
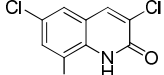
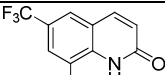
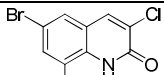
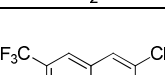
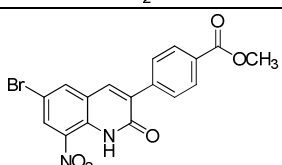
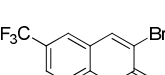
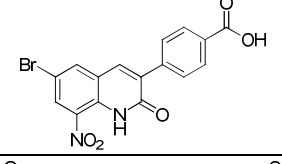
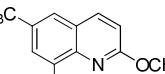
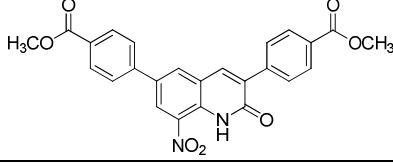
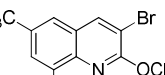
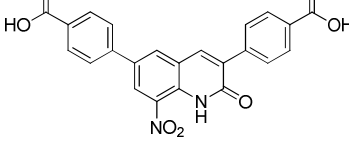
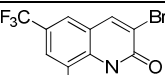
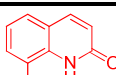
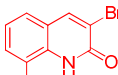
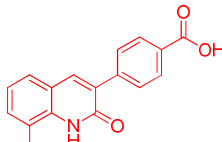


**Figure 97 :** Étude de l'effet de l'introduction d'un atome d'halogène en position 6 du pharmacophore sur les potentiels de réduction.

### 3. Evaluation de l'activité biologique *in vitro* des molécules synthétisées.

Toutes les molécules obtenues au terme de ce travail de synthèse organique ont été évaluées sur la lignée cellulaire HepG2, la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*.

### 3.1. Évaluation de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2.

Numéro	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	Numéro	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)
62		> 100	73		16,6 ± 1,2
63		> 100	74		27,9 ± 6,0
65		> 100	75		24,3 ± 0,9
66		41,3 ± 3,9	76		17,9 ± 2,5
67		31,4 ± 3,3	77		NS
68		41,0 ± 2,5	78		60,4 ± 14,4
69		> 100	79		NS
70		> 3,12	80		> 100
71		> 100	22		164 ± 28
24		92 ± 13	56		120 ± 7
Doxorubicine		0,2 ± 0,02	Suramine		> 100
Éflornithine		> 100	Fexinidazole		> 200
Amphotéricine B		5,5 ± 0,25	Miltéfosine		85 ± 8,8

**Tableau 36 :** Évaluation de la cytotoxicité des nouvelles molécules synthétisées. En bleu, les CC<sub>50</sub> des molécules les moins cytotoxiques (CC<sub>50</sub> > 50 μM) et en rouge les hits précédemment identifiés.

Les résultats de l'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2 sont présentés dans le tableau 36. Ces premiers résultats indiquent que la substitution de la position 6 par un groupement trifluorométhyle ou par un atome d'halogène conduit à l'obtention de molécules peu ou non cytotoxiques aux concentrations testées et est généralement en faveur d'une bonne solubilité en milieu biologique. En effet, parmi les 17 dérivés évalués, seules les molécules **70**, **77** et **79** présentent une faible hydrosolubilité. Les molécules **77** et **79** sont substituées par un ou deux groupements *p*-carboxyméthylphényle, un groupement qui avait déjà conduit à des composés insolubles en milieu aqueux lors des études de RSA présentées dans le chapitre 4 (molécules **53**, **54** et **55**).

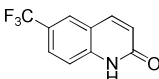
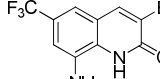
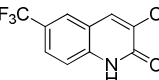
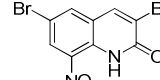
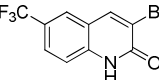
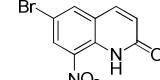
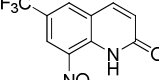
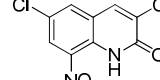
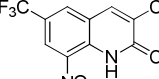
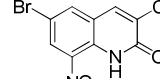
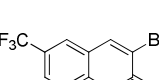
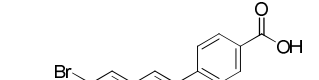
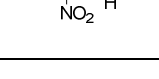
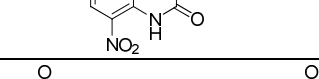
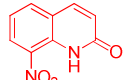
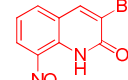
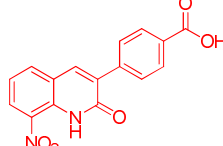
Par ailleurs, les molécules substituées à la fois en position 6 du noyau quinoléin-2(1H)-one par un groupement trifluorométhyle et en position 3 par un atome d'hydrogène (molécule **66**), de chlore (molécule **63**) ou de brome (molécule **65**) ne sont pas cytotoxiques, avec des CC<sub>50</sub> supérieures à 100 µM. Lorsque ces dérivés sont également substitués en position 8 par un groupement nitro, une cytotoxicité modérée apparaît, avec des valeurs de CC<sub>50</sub> comprises entre 31,4 µM et 41,3 µM (molécules **66-68**). De plus, si la molécule **66** possède une CC<sub>50</sub> de 41,3 µM, son analogue *O*-méthylé **69** est moins cytotoxique (CC<sub>50</sub> > 100 µM).

Enfin, les molécules substituées en position 6 par un atome d'halogène sont plus toxiques que les autres dérivés de cette série, avec des valeurs de CC<sub>50</sub> comprises entre 16,6 et 27,9 µM. Ainsi, la 6-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **74** est environ 6 fois plus cytotoxique que son analogue non substitué par un atome de brome (molécule **22**) tandis qu'elle est 3 fois plus toxique que son isomère de position **24**. La fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoléin-2(1H)-one par un groupement *p*-carboxyphényle a par ailleurs permis d'améliorer les valeurs de CC<sub>50</sub> obtenues pour des dérivés de cette série, la molécule **78** possédant une CC<sub>50</sub> de 60 µM (soit environ 4 fois supérieure à celle de la molécule dibromée **73**), tandis que la molécule **80** est non cytotoxique.

### 3.2. Évaluation de l'activité antileishmanienne.

Toutes les molécules qui ont présenté une solubilité en milieu biologique suffisante pour être évaluées lors du test de cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2 ont ensuite été criblées sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* (Tableau 37). Sur les 14 molécules testées, 8 présentent des CI<sub>50</sub> comprises entre 3,9 µM et 18 µM. Par ailleurs, les molécules ne comportant pas de groupement nitro en position 8 (molécules **62**, **63**, **65** et **71**) ou celle dont le motif lactame a été remplacé (molécule **69**) sont inactives sur ce parasite, confirmant l'importance de l'interaction entre le groupement nitro et le motif lactame dans l'activité antileishmanienne des dérivés de cette série.

La molécule **80**, substituée en position 3 et 6 par un groupement *p*-carboxyphényle est également inactive mais l'absence d'activité antileishmanienne pourrait ici être attribuée à une gêne stérique induite par ces deux groupements volumineux. La synthèse et l'évaluation biologique d'une série restreinte de quinoléin-2(1H)-one arylées à la fois en position 3 et 6 pourra être envisagée afin d'étudier cette hypothèse.

N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)	N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. inf</i> ama. axénique (μM)
62		> 100	71		> 100
63		> 100	73		6,5 +/- 1,8
65		> 100	74		11,6 +/- 2,5
66		18,5 +/- 3,9	75		6,2 +/- 0,6
67		9,2 +/- 1,5	76		6,7 +/- 0,8
68		3,9 +/- 1,5	78		8,0 +/- 1,5
69		> 100	80		> 100
22		15,5 +/- 0,5	24		7,1 +/- 1,5
56		> 100	Amphotéricine B		0,06 +/- 0,001
			Miltéfosine		0,8 +/- 0,02
			Fexinidazole		3,4 +/- 0,8

**Tableau 37 :** Evaluation de l'activité antileishmanienne sur la forme amastigote axénique de *L. infantum*. En bleu sont représentées les CI<sub>50</sub> des molécules actives (CI<sub>50</sub> > 20 μM) et en rouge les hits précédemment identifiés.

L'introduction d'un groupement trifluorométhyle en position 6 (molécule **66**) du pharmacophore conduit à un dérivé qui possède un niveau d'activité similaire au composé non substitué **22**, avec une  $CI_{50}$  de 18,5  $\mu M$ . Cependant, lorsque la présence de ce groupement électroattracteur en position 6 du noyau est associée avec celle d'un atome de chlore (molécule **67**) ou d'un atome de brome (molécule **68**) en position 3, l'activité antileishmanienne est améliorée d'un facteur 3 à 5, avec des  $CI_{50}$  de respectivement 9,2 et 3,9  $\mu M$ .

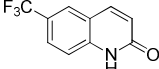
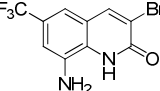
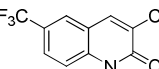
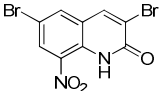
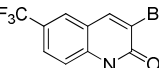
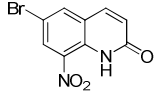
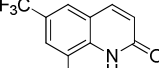
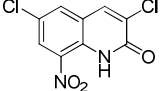
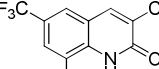
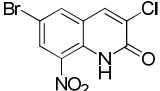
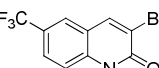
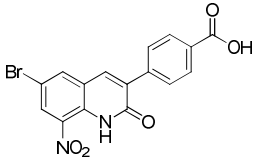
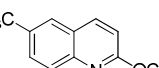
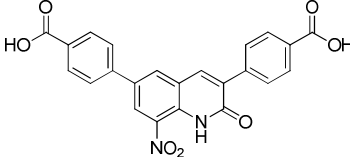
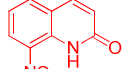
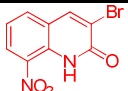
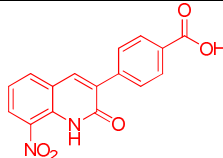
Par ailleurs, la molécule substituée par un atome de brome en position 6 (molécule **74**) est deux fois moins active que son isomère de position **24**, indiquant que la substitution de la position 3 de ce pharmacophore par un atome d'halogène permet l'obtention des dérivés antileishmaniens les plus puissants dans cette série. De plus, les molécules dihalogénées en position 3 et 6 (molécules **73-76**) présentent un niveau d'activité similaire à celui de la molécule **24** avec des  $CI_{50}$  comprises entre 6 et 7  $\mu M$ .

Enfin, lors des études de RSA en position 3 réalisées dans le chapitre 4, la molécule **56** avait été identifiée comme une molécule inactive sur *Leishmania infantum*. Cependant, l'introduction d'un atome de brome en position 6 de ce composé (molécule **78**) conduit à une molécule active possédant une  $CI_{50}$  de 8  $\mu M$ . Une hypothèse pourrait être formulée à partir de l'analyse des potentiels de réduction de ces deux molécules. En effet, lors de l'étude électrochimique réalisée précédemment, une limite de potentiel aux alentours de - 0,58 V avait semblé séparer les molécules actives des molécules inactives sur la forme amastigote axénique de *L. infantum* (page 131). Or, si la molécule **56** possède un potentiel de réduction de - 0,56 V, à la limite de ce potentiel seuil théorique, l'introduction de l'atome de brome induit une augmentation de ce potentiel à - 0,40 V : le potentiel de réduction plus élevé de la molécule **78** pourrait ainsi faciliter la bioactivation par la nitroréductase parasitaire menant à l'activité leishmanicide de ce dérivé.

Les dérivés les plus actifs sur *L. infantum* identifiés au cours de ce criblage sont les molécules **68**, **73**, **75** et **76**. Ces 4 molécules possèdent une  $CI_{50}$  inférieure à celle du hit anti-kinétoplastidés **24** avec des valeurs comprises entre 3,9  $\mu M$  et 6,7  $\mu M$ . Néanmoins, l'augmentation de l'activité antileishmanienne est à contrebalancer avec une cytotoxicité nettement supérieure. Ainsi, les index de sélectivité de ces molécules ( $2,5 < IS < 4$ ) sont plus faibles que celui de la molécule **24** ( $IS = 13$ ), ce qui limite l'intérêt de leur développement comme agent anti-*Leishmania*.

### 3.3. Évaluation de l'activité anti-*Trypanosoma*

Toutes les molécules qui ont été évaluées sur *Leishmania infantum* ont également été testées sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei*. Les résultats sont présentés dans le tableau 38 et les  $CI_{50}$  comparées à celles de la suramine, de l'éflornithine et du fexinidazole, les molécules anti-*Trypanosoma* de référence.

N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypom. (μM)	N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypom. (μM)
62		> 50	71		8,37 ± 3,2
63		> 50	73		<b>0,05 ± 0,008</b>
65		> 50	74		<b>0,07 ± 0,01</b>
66		1,7 ± 0,9	75		<b>0,1 ± 0,04</b>
67		<b>0,57 ± 0,25</b>	76		<b>0,012 ± 0,002</b>
68		<b>0,2 ± 0,09</b>	78		<b>0,06 ± 0,01</b>
69		20,9 ± 14,5	80		3,20 ± 0,8
22		<b>23,4 ± 5,7</b>	24		<b>1,9 ± 0,4</b>
56		<b>1,5 ± 0,2</b>	Suramine		<b>0,03 ± 0,009</b>
			Éflornithine		<b>15,8 ± 2,1</b>
			Fexinidazole		<b>0,4 ± 0,2</b>

**Tableau 38 :** Évaluation de l'activité anti-*Trypanosoma* sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei*. En bleu sont représentées les CI<sub>50</sub> des molécules actives (CI<sub>50</sub> > 1 μM) et en rouge les hits précédemment identifiés.

Parmi les 14 molécules testées dans cette série, 7 sont particulièrement actives sur ce parasite avec des valeurs de CI<sub>50</sub> comprises entre 0,012 et 0,57 μM. La présence du groupement nitro semble indispensable les molécules **62**, **63** et **65** étant inactives tandis que le dérivé réduit **71** n'est que peu actif (CI<sub>50</sub> = 8,37 μM).

Par ailleurs, la molécule substituée en position 6 par un groupement trifluorométhyle (molécule **66**) possède une activité similaire à celle de la molécule **24** possédant un atome de brome en position 3. Lorsque ces deux groupements sont couplés sur un même dérivé (molécule **68**), l'activité antileishmanienne est multipliée par 10 (CI<sub>50</sub> = 0,2 μM) en comparaison avec celle du hit antikinétoplastidés **24**.



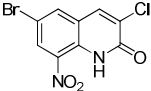
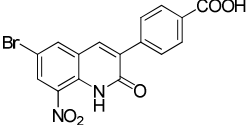
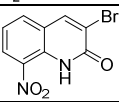
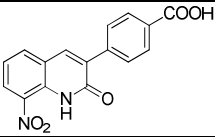
L'introduction d'un atome d'halogène en position 6 du pharmacophore conduit à des molécules très actives ayant des  $CI_{50}$  comprises entre 0,012 et 0,1  $\mu M$ . La molécule substituée en position 6 par un atome de brome est ainsi 27 fois plus active que son isomère de position **24**, substitué en position 3. Les molécules dihalogénées sont les puissantes de cette série, la molécule **76** étant la plus active avec une  $CI_{50}$  de 0,012  $\mu M$  soit 158 fois plus élevée que celle de la molécule hit **24** précédemment identifiée.

Enfin, lors des études de RSA en position 3 du pharmacophore, la molécule **56** substituée en position 3 par un groupement *p*-carboxyphényle avait été identifiée comme un hit anti-*Trypanosoma* avec une  $CI_{50}$  de 1,5  $\mu M$ . Lorsqu'un atome de brome est introduit en position 6 de ce dérivé, l'activité antileishmanienne est augmentée d'un facteur 25, soulignant l'importance de cette position dans l'activité trypanocide. Deux molécules hits ont ainsi été identifiées au cours de ce criblage : les molécules **76** et **78**, présentant des  $CI_{50}$  respectives de 0,012  $\mu M$  et 0,06  $\mu M$ . Ces deux dérivés sont respectivement 33 et 7 fois plus actifs que le fexinidazole ( $CI_{50} = 0,4 \mu M$ ), et beaucoup plus puissants que l'eflornithine ( $CI_{50} = 15,8 \mu M$ ), un médicament sur le marché contre la trypanosomiose humaine africaine. Le dérivé **76** est même 2 fois plus actif que la suramine ( $CI_{50} = 0,03 \mu M$ ), molécule sur le marché présentant à ce jour les meilleurs niveaux d'activité *in vitro*. Ces molécules par ailleurs possèdent des index de sélectivité de respectivement 1491 et 1007, potentiellement supérieurs à celui du fexinidazole ( $IS > 500$ ) et très largement supérieurs à celui de l'eflornithine ( $IS > 6$ ).

### 3.4.Bilan des RSA

A la suite de ces différents résultats d'activité biologique, les molécules **76** et **78** ont été choisies comme nouveaux hits anti-*Trypanosoma* avec des  $CI_{50}$  respectives de 0,012 et 0,06  $\mu M$ . Leurs profils d'activité biologique sont présentés dans le tableau 39 et comparés avec ceux des hits précédemment identifiés et des molécules antiparasitaires de référence.

Par comparaison avec les hits précédemment identifiés **24** et **56**, l'activité anti-*Trypanosoma* des molécules **76** et **78** a été nettement améliorée. Malgré une relative cytotoxicité de ces deux composés, leur index de sélectivité a respectivement été augmenté d'un facteur 18 et 12 en comparaison avec celui de la molécule **56**, qui était la molécule anti-*Trypanosoma* la plus prometteuse jusqu'à maintenant. A contrario, le profil antileishmanien de ces deux molécules est nettement moins intéressant avec un index de sélectivité inférieur à celui du hit antikinétoplastidés **24**. Le développement de ces deux molécules apparaît ainsi plus intéressant en tant qu'agents anti-*Trypanosoma* plutôt qu'antileishmanien.

N°	Structure	CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. inf ama.</i> axénique (μM)	CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. (μM)	IS CC <sub>50</sub> HepG2/ CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i>	IS CC <sub>50</sub> HepG2/ CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i>
76		17,9 ± 2,5	6,7 ± 0,8	0,012 ± 0,002	2,7	1492
78		60,4 ± 14,4	8,0 ± 1,5	0,06 ± 0,01	7,5	1007
24		92 ± 13	7,1 ± 1,5	1,9 ± 0,4	13	48,4
56		120 ± 7	> 100	1,5 ± 0,2	-	80
Amphotéricine B		5,5 ± 0,25	0,06 ± 0,001	-	92	-
Mitréfosine		85 ± 8,8	0,8 ± 0,02	-	106	-
Fexinidazole		> 200	3,4 ± 0,8	0,4 ± 0,2	> 59	> 500
Suramine		> 100	-	0,02 ± 0,009	-	> 5000
Éflornithine		> 100	-	15,8 ± 2,1	-	> 6

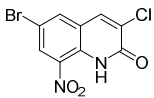
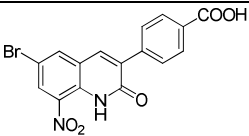
**Tableau 39 :** Profil d'activité biologique des meilleures molécules de cette série, des hits précédemment identifiés et des substances actives de référence.

#### 4. Évaluation du potentiel pharmaceutique des molécules de cette série

Afin de déterminer leur potentiel pharmaceutique, des études mécanistiques ont été effectuées sur les molécules **76** et **78**. De plus, l'évaluation de la génotoxicité de ceux deux composés a été réalisée ainsi que la détermination de paramètres préliminaires *in vitro* pharmacocinétiques incluant la stabilité microsomale, la fixation à l'albumine humaine et le passage de la barrière hémato-encéphalique.

##### 4.1. Recherche du mécanisme d'action antiparasitaire.

Des études mécanistiques ont été réalisées sur les molécules **76** et **78** *via* leur évaluation biologique sur des souches qui surexpriment les nitroréductases parasitaires afin d'évaluer le rôle de ces enzymes dans la bioactivation de ces deux dérivés. Pour cela, une comparaison est effectuée entre la CI<sub>50</sub> de ces molécules sur une souche sauvage du parasite et la CI<sub>50</sub> sur des souches qui surexpriment respectivement NTR1 et NTR2.

N°	Structure	CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> promastigote sauvage (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> promastigote NTR1 <sup>SE</sup> (μM)	CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> promastigote NTR2 <sup>SE</sup> (μM)
76		4,7 ± 0,2	0,3 ± 0,05	2,9 ± 0,3
78		2,0 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
	Féxinidazole	7,2 ± 0,1	0,4 ± 0,01	4,6 ± 0,03

**Tableau 40 :** Activités biologiques des hits **76** et **78** sur des souches sauvages de *L. donovani* ou sur des souches surexprimant la NTR1 ou la NTR2.<sup>279,283</sup>

Nous pouvons donc constater que la molécule **76** est 16 fois plus active sur la souche de *L. donovani* qui surexprime la NTR1 que sur la souche sauvage, indiquant une bioactivation sélective par cette enzyme. A l'inverse, la molécule **78** semble moins bioactivée par la NTR1 de *Leishmania* que la molécule **76** avec une diminution de la CI<sub>50</sub> sur la souche qui surexprime cette nitroréductase d'un facteur 1,5. La présence du groupement *p*-carboxyphényle en position 3 du pharmacophore, un groupement volumineux, semble influencer la voie d'activation des molécules de cette série, menant à la diminution de la bioactivation par cette enzyme. Un tel résultat avait déjà été observé dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action anti-*Trypanosoma* de la molécule **56**, substituée en position 3 par le même groupement *p*-carboxyphényle.

L'évaluation biologique de ces deux molécules sur des souches de *T. b. brucei* qui surexpriment la nitroréductase de type 1 de *Trypanosoma* est actuellement en cours, à l'Université de Dundee. Il sera intéressant de comparer ces résultats avec ceux de la bioactivation par les nitroréductases de *Leishmania*, qui semblent indiquer que la molécule **76** est bioactivée par une nitroréductase de type 1 tandis que la molécule **78**, tout comme la molécule **56**, pourrait agir sur une autre cible parasitaire.

## 4.2. Évaluation de la génotoxicité.

Avec comme objectif d'évaluer la génotoxicité de ces deux molécules, un test des comètes a été réalisé. Ce test permet de quantifier par électrophorèse les dégâts causés sur l'ADN après une période d'incubation avec la molécule testée.

<sup>279</sup> S. Wyllie, S. Patterson et A. H. Fairlamb, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2013**, 57, 901-906.

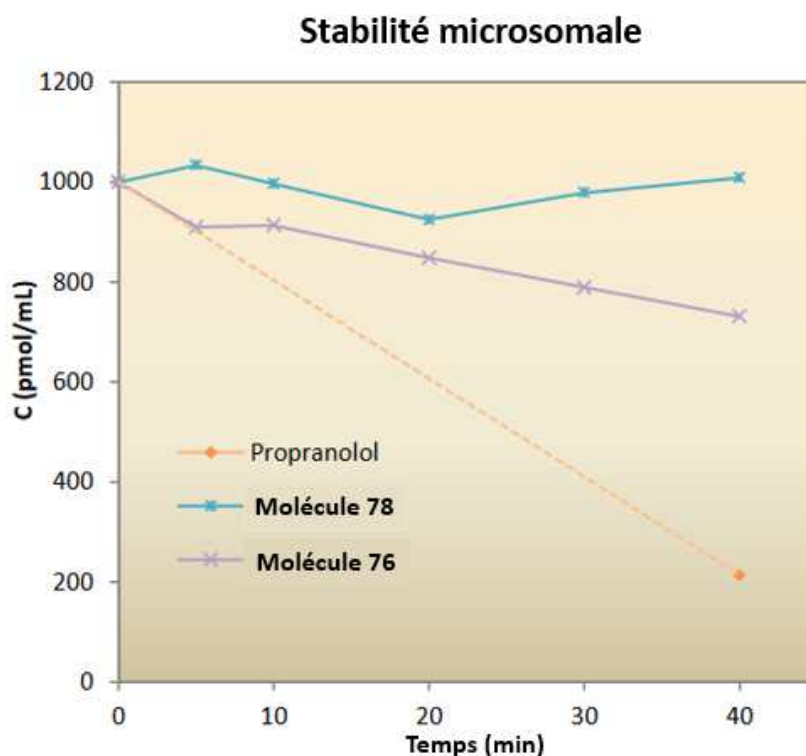
<sup>283</sup> S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval *et al.*, *PLoS Pathog.*, **2016**, 12, e1005971.

Ainsi, si l'observation des images prises au cours de ce test des comètes semble indiquer que ces deux molécules ne sont pas génotoxiques, le traitement des données incluant le comptage des cellules et la détermination du degré de génotoxicité est en cours.

### 4.3. Études pharmacocinétiques *in vitro*

#### 4.3.1. Stabilité microsomale.

En vue d'évaluer le potentiel pharmaceutique des molécules **76** et **78**, des tests préliminaires de pharmacocinétiques *in vitro* ont été effectués. La stabilité microsomale de ces deux molécules a ainsi été mesurée *in vitro* par chromatographie en phase liquide, après incubation de ces composés en présence de microsomes hépatiques de souris femelles.



**Figure 98 :** Représentation graphique de la stabilité microsomale des molécules **76** et **78**.

Ces deux molécules sont donc stables en présence microsomes hépatiques avec des demies-vie supérieures à 40 minutes. De plus, elles sont faiblement métabolisées avec un pourcentage de métabolisation au bout de 40 minutes de 29 % pour la molécule **76** et de 0 % pour la molécule **78**, en comparaison avec le propranolol (contrôle positif) qui est métabolisé à hauteur de 79 % dans les mêmes conditions expérimentales.

#### 4.3.2. Fixation à l'albumine.

Le pourcentage de liaison à l'albumine humaine de ces deux molécules a également été déterminé par un suivi LCMS, après une période d'incubation en présence de plasma humaine et comparé à celui de deux médicaments de référence : le diclofénac et la warfarine.

Molécule	% lié	Fraction libre (fu)	Log (fu)
<b>76</b>	<b>99,2</b>	0,0098	-2,007
<b>78</b>	<b>&gt; 99</b>	< 0,001	< 2,000
Warfarine	99,07	0,0093	-2,032
Diclofénac	99,79	0,0021	-2,673

**Tableau 41** : Résultats du test de fixation à l'albumine des molécules **76** et **78**.

Ces deux molécules sont donc fortement liées à l'albumine humaine avec un taux de fixation supérieur à 99 % pour la molécule **78** et de 99,2 % pour la molécule **76**. Ce paramètre pourrait donc être une limite au développement *in vivo* de ces molécules en tant qu'agent anti-*Trypanosoma*, une fixation trop importante aux protéines plasmatiques pouvant aboutir à une réduction de l'activité biologique. Cependant, il y a des exceptions à cette règle comme les molécules qui se lient de façon covalente à leur cible biologique, déplaçant l'équilibre entre la fraction libre et la fraction fixée au fur et à mesure que la molécule se lie avec sa cible.<sup>355</sup>

#### 4.3.3. Test du franchissement de la barrière hémato-encéphalique.

En vue d'un développement des molécules **76** et **78** comme agents anti-*Trypanosoma*, un paramètre clé à déterminer est la faculté de ces dérivés à traverser la barrière hémato-encéphalique. En effet, au cours de la phase neurologique de la maladie, le parasite est localisé au niveau du système nerveux central : l'efficacité des agents anti-infectieux utilisés est donc conditionnée par leur bon franchissement de la BHE. Pour étudier ce paramètre, nous avons réalisé un test PAMPA sur un modèle de barrière hémato-encéphalique qui permet d'évaluer la diffusion passive d'une molécule à travers une bicouche lipidique.

Molécule	Concentration (μM)	logPe	Pe (10 <sup>-6</sup> cm/s)	Interprétation
<b>76</b>	100	4,40 ± 0,07	40,51 ± 6,93	<b>Diffuse</b>
<b>78</b>	100	- 5,90 ± 0,3	1,27 ± 0,09	<b>Diffuse moyennement</b>
Théophylline	250	- 6,22 ± 0,07	0,60 ± 0,10	<b>Ne diffuse pas</b>
Corticostérone	100	- 4,86 ± 0,07	3,86 ± 2,20	<b>Diffuse</b>

**Tableau 42** : Evaluation de la perméabilité des molécules **76** et **78** pour la BHE par le test PAMPA

<sup>355</sup> D. A. Smith, L. Di, E. H. Kerns, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 929–939.

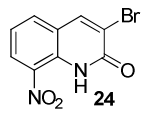
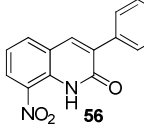
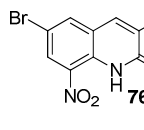
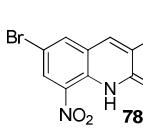
Au cours de test, la théophylline est utilisée comme contrôle négatif du passage de la BHE tandis que la corticostérone est le contrôle positif. Ainsi, la molécule **76** possède un Pe 10 fois plus élevé que celui de la corticostérone, indiquant que ce composé franchit correctement la barrière hémato-encéphalique. La molécule **78** diffuse quant à elle moyennement avec un Pe compris entre celui de la théophylline et celui de la corticostérone. Par ailleurs, le test PAMPA effectué sur la molécule **56** avait démontré que cette molécule ne diffusait pas à travers une bicouche lipidique. L'introduction d'un atome de brome en position 6 de cette molécule a donc permis d'augmenter sa lipophile, entraînant une amélioration de sa diffusion à travers la BHE malgré la présence d'un groupement acide carboxylique, groupement polaire chargé négativement à pH physiologique.

## 5. Conclusion.

Au cours de ce travail de pharmacomodulation anti-*Trypanosomatidés* en position 6 du pharmacophore quinoléin-2(1H)-one, 19 nouvelles molécules ont été synthétisées par introduction d'un groupement électroattracteur (trifluorométhyle ou atome d'halogène) sur le noyau, couplée à la substitution de la position 3 par les meilleurs groupements identifiés lors des études de RSA précédentes. Pour cela, les dérivés portant un groupement trifluométhyle ont été préparés à partir de la *para*-nitroaniline. Une réaction de cyclocondensation a tout d'abord permis de former la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one, puis différentes réactions de nitration, d'halogénéation et de méthylation ont abouti à l'obtention de 10 molécules. En vue d'introduire notamment un atome d'halogène en position 6, une mise au point de la réaction d'halogénéation sélective ou de dihalogénéation de la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one a été réalisée, permettant la synthèse de 5 nouvelles molécules. Enfin, à partir du dérivé 3,6-dibromé, l'optimisation de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura a permis d'introduire le meilleur groupement identifié lors des études de RSA de la position 3 présentée dans le chapitre 4, mais aussi de réaliser des couplages symétrique en positions 3 et 6 du noyau.

L'évaluation biologique des composés de cette série a permis d'identifier deux molécules hits anti-*Trypanosoma*. Les molécules **76** et **78** sont substituées en position 6 par un atome de brome mais se différencient par la nature du substituant en position 3 qui est un atome de chlore pour le dérivé **76** et un groupement *p*-carboxyphényl pour le composé **78**. Ces deux molécules démontrent des activités antileishmaniennes similaires au hit antikinétoplastidés **24** mais des activités anti-*Trypanosoma* bien supérieures, avec des  $CI_{50}$  de respectivement 0,012  $\mu$ M et 0,06  $\mu$ M. Malgré une certaine cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2, les molécules **76** et **78** possèdent des index de sélectivité de 1491 et 1007 toujours inférieurs à celui de la suramine ( $IS > 3333$ ), mais plus élevés que celui du fexinidazole ( $IS > 500$ ) et très largement supérieurs à celui de l'éflornithine ( $IS > 6$ ).

Enfin, les molécules **76** et **78** sont stables en présence de microsomes hépatiques de souris femelles et se lient à l'albumine humaine à hauteur de 99 %. Par ailleurs, ces deux molécules se différencient lors des tests de bioactivation par les nitroréductases parasitaires et lors du test de franchissement de la BHE : en effet, la molécule **76** est bioactivée par la nitroréductase de type I de *Leishmania* et diffuse à travers la barrière hémato-encéphalique (test PAMPA) ; au contraire, la molécule **78** ne semble que partiellement bioactivée par la NTR1 de *Leishmania* et ne diffuse que modérément à travers la bicouche lipidique du test PAMPA. Ces deux composés sont donc des agents anti-*Trypanosoma* prometteurs, répondant aux critères qui définissent un hit antiparasitaire incluant des  $CI_{50} < 10 \mu M$ , des  $IS > 10$  et une bonne stabilité microsomale. Des études *in vivo* sont désormais à prévoir afin de juger de leur potentiel pharmaceutique en tant que molécules « lead ».

				
CC <sub>50</sub> HepG2 (μM)	92 ± 13	120 ± 7	17,9 ± 2,5	60,4 ± 14,4
CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. axénique (μM)	7,1 ± 1,5	> 100	6,7 ± 0,8	8,0 ± 1,5
CI <sub>50</sub> <i>T. b. brucei</i> trypoma. (μM)	1,9 ± 0,44	1,5 ± 0,2	0,012 ± 0,02	0,06 ± 0,01
IS <i>Trypanosoma</i>	48	80	1491	1007
Stabilité microsomale	> 40 min	> 40 min	> 40 min	> 40 min
Test PAMPA BHE	-	Ne diffuse pas	Diffuse	Diffuse moyennement

**Tableau 43 :** Comparaison des profils biologiques des hits **76** et **78** avec les hits précédemment identifiés **24** et **56**.



## PARTIE EXPERIMENTALE DU CHAPITRE 5

### 1. Méthodes Générales

Les méthodes générales sont présentées dans la partie expérimentale du chapitre 3, page 144.

### 2. Partie Chimie

#### Préparation de la 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **62**<sup>344</sup>

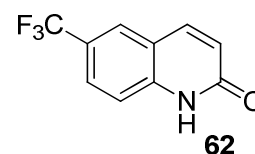
Dans une première étape, 4,5 g de chlorure de 3,3'-diéthoxyacryloyle (33,4 mmol, 1,2 équiv.), préparés depuis l'acide 3,3'-diéthoxypropionique par réaction avec du SOCl<sub>2</sub>, ont été ajoutés au goutte à goutte à t.a. à une solution de 3,5 mL de *p*-trifluorométhylaniline (27,8 mmol, 1 équiv.) et 4,5 mL de pyridine (55,6 mmol, 2 équiv.) solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane dans un ballon bicol de 250 mL. Après 6 h, le milieu réactionnel a été versé dans un bécher d'eau, alcalinisé par du HCl à 37% et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 100 mL). La phase organique résultante a été lavée avec du brine, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite pour donner une huile noire. Dans une seconde étape, 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 98% ont été ajoutés au brut réactionnel et le milieu agité à t.a. pendant 2 h. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, extrait deux fois avec du dichlorométhane (2 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Le composé **62** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre blanche avec un rendement de 42% (11,68 mmol, 2,5 g).

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>F<sub>3</sub>NO

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 201 °C.

Masse Molaire : 213,16 g/mol.



<sup>344</sup> F. Zaragoza, H. Stephensen, B. Peschke *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 306-311

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>F<sub>3</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 214,0480, trouvée 214,0468.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,83 (d, J= 9,6 Hz, 1 H, H4) ; 7,54 (d, J=8,7 Hz, 1 H, H8) ; 7,76 (dd, J= 1,8 et 8,7 Hz, 1 H, H7) ; 7,89 (s, 1 H, H5) ; 7,90 (d, J= 9,6 Hz, 1 H, H3) ; 12,43 (sl, 1 H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 116,8 (CH) ; 119,3 (C) ; 122,9 (CH) ; 123,9 (q, J=271,6 Hz ; C) ; 125,2 (q, J=33,2 Hz ; C) ; 125,4 (q, J=4,1 Hz ; CH) ; 127,1 (q, J=3,4 Hz ; CH) ; 140,4 (C) ; 140,8 (CH) ; 161,6 (C).

### Préparation de la 3-chloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **63** et de la 3,8-dichloro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **64**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL de HCl à 37% ont été ajoutés sur 500 mg de 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **62** (2,35 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C avant que 300 mg de chlorate de sodium (2,8 mmol, 1,2 équiv.) soient ajoutés avec précaution (Dégagement de Cl<sub>2</sub>). Après 7 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de Cl<sub>2</sub> restantes, et a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée avec de l'eau, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de **63** et **64** ont été isolés et recristallisés dans l'isopropanol sous forme de poudres blanches avec des rendements respectifs de 48% (1,1 mmol, 280 mg) et 12% (0,28 mmol, 80 mg).

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>ClF<sub>3</sub>NO

Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 210 °C.

Masse Molaire : 249,62 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>ClF<sub>3</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 248,0090, trouvée 248,0079.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,63 (d, J= 8,7 Hz, 1 H, H8) ; 7,76 (dd, J= 8,8 et 1,4 Hz, 1 H, H7) ; 7,83 (s, 1 H, H5) ; 8,07 (s, 1 H, H4), 12,6 (sl, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 117,0 (CH) ; 119,0



(C) ; 123,7 (q, J= 271,8 Hz, C) ; 124,6 (q, J= 4,2 Hz, CH) ; 125,9 (q, J= 33,3 Hz, C) ; 127,1 (q, J= 3,3 Hz, CH) ; 128,0 (C) ; 138,0 (CH) ; 138,9 (C) ; 160,3 (C).

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO

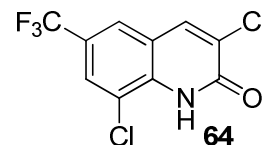
Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 203 °C.

Masse Molaire : 282,04 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 281,9700, trouvée 281,9696.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,74 (d, J= 1,9 Hz, 1 H, H5) ; 7,81 (d, J= 1,9 Hz, 1H, H7) ; 8,00 (s, 1H, H4) ; 9,46 (sl, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 119,8 (C) ; 120,0 (C) ; 122,9 (q, J= 272,3 Hz, C) ; 123,4 (q, J= 4,0 Hz, CH) ; 126,1 (q, J= 34,3 Hz, C) ; 126,8 (q, J= 3,5 Hz, CH) ; 130,1 (C) ; 135,5 (C) ; 136,9 (CH) ; 157,6 (C).



### Préparation de la 3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **65**<sup>391</sup>

Dans un tube scellé de 25 mL, 400 mg de 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **62** (1,87 mmol, 400 mg) et 835 mg de *N*-bromosuccinimide (4,69 mmol, 2,5 équiv.) ont été ajoutés. Après l'ajout de 10 mL d'acétonitrile, le milieu réactionnel a été chauffé à 140°C dans un réacteur micro-onde pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois avec dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée deux fois avec de l'eau à pH=8, deux fois avec de l'eau à pH=4, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (75/25). Le composé **65** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre blanche avec un rendement de 54% (1,0 mmol, 293 mg).

<sup>391</sup> T. N. Glasnov, W. Stadlbauer, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3864-3870.

Formule brute :  $C_{10}H_5BrF_3NO$

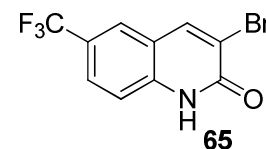
Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 233 °C.

Masse Molaire : 294,07 g/mol.

HRMS (ESI-) calculée pour  $C_{10}H_4BrF_3NO$   $[M-H]^-$  289.9428, trouvée 289.9433.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,58 (d,  $J$ = 8,7 Hz, 1 H, H8) ; 7,78 (dd,  $J$ = 8,7 et 1,6 Hz, 1 H, H7) ; 7,83 (s, 1 H, H5) ; 8,29 (s, 1 H, H4) ; 12,23 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 116,9 (CH) ; 118,6 (C) ; 119,5 (C) ; 123,7 (q,  $J$ = 272,0 Hz, C) ; 124,5 (q,  $J$ = 4,1 Hz, CH) ; 125,8 (q,  $J$ = 33,4 Hz, C) ; 127,3 (q,  $J$ = 3,4 Hz, CH) ; 139,5 (C) ; 142,0 (CH) ; 160,2 (C).



### Préparation de la 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one 66

Dans un ballon bicol de 50 mL refroidi par un bain de glace, 10 mL de  $H_2SO_4$  (98%) ont été ajoutés sur 500 mg de 6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **62** (2,34 mmol, 1 équiv.). Une solution de 0,96 mL de  $HNO_3$  à 65% (14,1 mmol, 5 équiv.) a ensuite été ajoutée au goutte à goutte à 0°C et le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $K_2CO_3$ , extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle. Le composé **66** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune pâle avec un rendement de 89% (2,1 mmol, 540 mg).

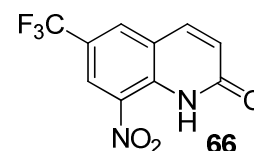
Formule brute :  $C_{10}H_5F_3N_2O_3$

Apparence : Poudre jaune pâle.

Point de fusion : 177 °C.

Masse Molaire : 258,16 g/mol.

HRMS (ESI+) calculée pour  $C_{10}H_6F_3N_2O_3$   $[M+H]^+$  259,0331 trouvée 259,0333.



RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,86 (dd,  $J = 9,8$  et  $1,9$  Hz, 1 H, H3) ; 7,85 (d,  $J = 9,8$  Hz, 1 H, H4) ; 8,12 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H5) ; 8,73 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H7) ; 11,33 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 122,4 (C) ; 122,6 (q,  $J = 271,6$  Hz, C) ; 124,1 (q,  $J = 35,2$  Hz, C) ; 124,8 (q,  $J = 3,6$  Hz, CH) ; 125,2 (CH) ; 131,9 (q,  $J = 3,4$  Hz, CH) ; 132,7 (C) ; 135,7 (C) ; 139,5 (CH) ; 161,0 (C).

### Préparation de la 3-chloro-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **67**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL de HCl à 37% ont été ajoutés sur 150 mg de 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **66** (0,58 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a été ensuite chauffé à  $100^\circ\text{C}$  avant que 186 mg de chlorate de sodium (1,74 mmol, 3 équiv.) soient ajoutés avec précaution (dégagement de  $\text{Cl}_2$ ). Après 2 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de  $\text{Cl}_2$  restantes. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le composé **67** a été isolé et recristallisé dans l'isopropanol sous forme de poudre jaune avec un rendement de 88% (0,51 mmol, 150 mg).

Formule brute :  $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$

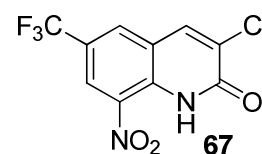
Apparence : Poudre jaune pâle.

Point de fusion :  $153^\circ\text{C}$ .

Masse Molaire : 294,61 g/mol.

HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calculée pour  $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  292,9941, trouvée 292,9933.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,06 (s, 1 H, H4) ; 8,10 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H5) ; 8,74 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H7) ; 11,55 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 122,1 (C) ; 122,4 (q,  $J = 272,6$  Hz, C) ; 124,6 (q,  $J = 3,7$  Hz, CH) ; 124,9 (C, q,  $J = 35,6$  Hz) ; 130,9 (C) ; 131,1 (q,  $J = 3,55$  Hz, CH) ; 132,9 (C) ; 134,2 (C) ; 136,4 (CH) ; 157,0 (C).



**Préparation de la 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **68****<sup>339</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL de HBr à 48% ont été ajoutés sur 350 mg de 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **66** (1,36 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C avant que 614 mg de bromate de sodium (4,07 mmol, 3 équiv.) soient ajoutés avec précaution (dégagement de Br<sub>2</sub>). Après 4 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de Br<sub>2</sub> restantes. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **68** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune pâle avec un rendement de 94% (1,27 mmol, 430 mg).

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

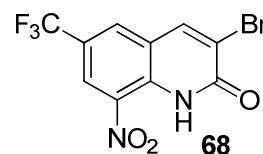
Apparence : Poudre jaune pâle.

Point de fusion : 168 °C.

Masse Molaire : 337,05 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 336,9436, trouvée 336,9437.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,10 (d, J= 2,0 Hz, 1 H, H5) ; 8,29 (s, 1 H, H4) ; 8,76 (d, J= 2,0 Hz, 1 H, H7) ; 11,51 (sl, 1 H, NH). RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 121,6 (C) ; 122,4 (q, J= 272,6 Hz, C) ; 122,5 (C) ; 124,7 (q, J= 3,6 Hz, CH) ; 124,7 (q, J= 35,4 Hz, C) ; 131,0 (q, J= 3,5 Hz, CH) ; 132,9 (C) ; 134,7 (C) ; 140,5 (CH) ; 157,1 (C).

**Préparation de la 2-méthoxy-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléine **69****<sup>338</sup>

Sous atmosphère inerte (Argon), 250 mg de 8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **66** (0,97 mmol, 1 équiv.) ont été solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre et ont été ajoutés sur une solution de 77

<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5419-5434.

mg d'hydruure de sodium à 60% (1,93 mmol, 2 équiv.) également solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre, dans un tube scellé de 25 mL. Après 10 min d'agitation à t.a., 120 µL d'iodure de méthyle (1,93 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 3 h, avant d'être versé dans un bain de glace et extrait quatre fois avec de l'acétate d'éthyle (4 fois 50 mL). La phase organique résultante a été successivement lavée deux fois avec du brine, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **69** a été isolé et recristallisé dans l'isopropanol sous forme de poudre blanche avec un rendement de 69% (0,66 mmol, 181 mg).

Formule brute : C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>

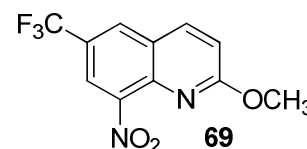
Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 165 °C.

Masse Molaire : 272,18 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 273,0487, trouvée 273,0474.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 4,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 7,13 (d, J=8,9 Hz, 1 H, H3) ; 8,13 (d, J= 8,9 Hz, 1H, H4) ; 8,16 (d, J=2,0 Hz, 1 H, H5) ; 8,20 (d, J=2,0 Hz, 1 H, H7). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 54,5 (CH<sub>3</sub>) ; 116,6 (CH) ; 120,3 (q, J=3,36 Hz, CH) ; 123,1 (q, J=272,4 Hz, C) ; 125,0 (q, J=35,0 Hz, C) ; 125,7 (C) ; 128,6 (q, J=3,98 Hz, CH) ; 138,9 (CH) ; 139,8 (C) ; 146,6 (C) ; 165,1 (C).



### Préparation de la 3-bromo-2-méthoxy-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléine **70**<sup>338</sup>

Sous atmosphère inerte, 60 mg de 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **68** (0,18 mmol, 1 équiv.) ont été solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre et ajoutés à une solution de 14 mg d'hydruure de sodium à 60% (0,36 mmol, 2 équiv.) solubilisés dans 5 mL de DMF anhydre, dans un tube scellé de 25 mL. Après 10 min d'agitation à t.a., 22 µL d'iodure de méthyle (0,36 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte. Le milieu réactionnel a été agité à t.a. pendant 24 h, avant d'être versé dans un bain de glace et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique résultante a été

<sup>338</sup> M. Naik, V. Humnabadkar, S. J. Tantry *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5419-5434.



lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **70** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 80% (0.14 mmol, 50 mg).

Formule brute : C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

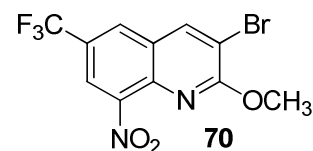
Apparence : Poudre blanchâtre.

Point de fusion : 149 °C.

Masse Molaire : 351,08 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 350,9592 trouvée 350,9575.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,18 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 8,15 (d, J= 2,0 Hz, 1 H, H5) ; 8,19 (d, J= 2,0 Hz, 1 H, H7) ; 8,44 (s, 1 H, H4). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 55,3 (CH<sub>3</sub>) ; 121,5 (CH, q, J= 3,6 Hz) ; 122,7 (C, q, J= 272,6 Hz) ; 124,6 (C) ; 125,0 (C, q, J= 35,4 Hz) ; 127,8 (CH, q, J= 3,5 Hz) ; 128,9 (C) ; 138,5 (C) ; 138,9 (CH) ; 140,4 (C) ; 161,4 (C).



### Préparation de la 8-amino-3-bromo-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **71**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 20 mL d'éthanol ont été ajoutés sur 130 mg de 3-bromo-8-nitro-6-trifluorométhylquinoléin-2(1H)-one **69** (0,38 mmol, 1 équiv.) et 365 mg de chlorure d'étain (II) (1,92 mmol, 5 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été porté à reflux pendant 5 h. Le mélange réactionnel a alors été neutralisé par une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, filtré sur célite, extrait deux fois avec du dichlorométhane (2 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été lavé avec de l'eau à pH=1 trois fois et le composé **71** a été isolé sous forme de poudre orange avec un rendement de 68% (0,26 mmol, 80 mg).

Formule brute :  $C_{10}H_6BrF_3N_2O$

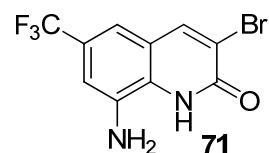
Apparence : Poudre orange.

Tdec: 238 °C.

Masse Molaire : 307,07 g/mol.

HRMS (ESI +) calculée pour  $C_{10}H_7BrF_3N_2O$   $[M+H]^+$  306,9694, trouvée 306,9700.

RMN  $^1H$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 6,03 (sl, 2 H,  $NH_2$ ) ; 7,06 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H7) ; 7,31 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1 H, H5) ; 8,55 (s, 1 H, H4) ; 11,67 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 109,6 (q,  $J = 4,3$  Hz, CH) ; 112,1 (q,  $J = 4,3$  Hz) ; 118,3 (C) ; 120,0 (C) ; 123,9 (q,  $J = 31,9$  Hz, C) ; 124,8 (q,  $J = 271,9$  Hz, C) ; 127,8 (C) ; 136,6 (C) ; 142,9 (CH) ; 158,4 (C).



### Préparation de 3,6,8-tribromoquinolin-2(1H)-one **72**<sup>339</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 30 mL de HBr à 48% ont été ajoutés sur 500 mg de quinolin-2(1H)-one **16** (3,44 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C avant que 519 mg de bromate de sodium (3,44 mmol, 1 équiv.) soient ajoutés avec précaution (dégagement de  $Br_2$ ). Après 5 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de  $Br_2$  restantes. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $K_2CO_3$  et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (80/20). Le composé **72** a été isolé sous forme de poudre blanche avec un rendement de 9% (0,32 mmol, 123 mg).

<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

Formule brute :  $C_9H_4Br_3NO$

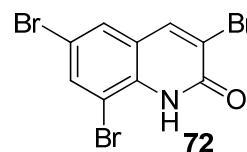
Apparence : Poudre blanche.

Point de fusion : 231 °C (Lit : 230-231 °C).<sup>394</sup>

Masse Molaire : 381,85 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_9H_5Br_3NO$   $[M+H]^+$  379,7921, trouvée 379.7928.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,65 (d,  $J=2,0$  Hz, 1 H, H5) ; 7,89 (d,  $J=2,0$  Hz, 1 H, H7) ; 8,09 (s, 1 H, H4) ; 9,18 (sl, 1H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 109,6 (C) ; 115,5 (C) ; 120,4 (C) ; 121,8 (C) ; 128,9 (CH) ; 134,1 (C) ; 135,9 (CH) ; 140,3 (CH) ; 157,6 (C).



### Préparation de la 3,6-dibromo-8-nitroquinolin-2(1H)-one **73**<sup>339</sup>

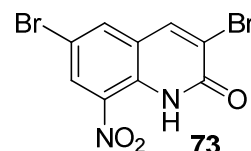
Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL de HBr à 48% ont été ajoutés sur 103 mg de 8-nitroquinolin-2(1H)-one **22** (0,54 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a ensuite été chauffé à 100°C avant que 408 mg de bromate de sodium (2,71 mmol, 5 équiv.) soient ajoutés avec précaution (dégagement de  $Br_2$ ). Après 48 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de  $Br_2$  restantes. Le mélange réactionnel a ensuite été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $K_2CO_3$  et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'éther diéthylique. Le composé **73** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec un rendement de 57% (0,31 mmol, 108 mg).

Formule brute :  $C_9H_4Br_2N_2O_3$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 202 °C.

Masse Molaire : 347,95 g/mol.



<sup>394</sup> M. Fernandez, E. de la Cuesta, C. Avendano, *Synthesis*, **1995**, 1362-1364

<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

HRMS (ESI-) calculée pour  $C_9H_3Br_2N_2O_3$   $[M-H]^-$  344,8510, trouvée 344,8508.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,96 (d,  $J$ = 2,2 Hz, 1 H, H5) ; 8,16 (s, 1 H, H4) ; 8,63 (d,  $J$ = 2,2 Hz, 1 H, H7) ; 11,38 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 114,1 (C) ; 121,3 (C) ; 123,5 (C) ; 130,4 (CH) ; 131,8 (C) ; 133,4 (C) ; 136,7 (CH) ; 139,8 (CH) ; 157,0 (C).

### Préparation de la 6-bromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **74**.<sup>396</sup>

Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL d'acide acétique ont été ajoutés sur 150 mg de 8-nitroquinolin-2(1H)-one **22** (0,79 mmol, 1 équiv.). Par la suite, 8  $\mu$ L de dibrome (1,58 mmol, 2 équiv.) ont été ajoutés au goutte à goutte et le milieu réactionnel a été porté à reflux avant d'être saturé en acétate de sodium et agité pendant 24 h. Le mélange réactionnel a alors été successivement versé dans un bain de glace, alcalinisé par du  $K_2CO_3$ , extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL) et une fois avec de l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (80/20). Le composé **74** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 9% (0,07 mmol, 20 mg).

Formule brute :  $C_9H_5BrN_2O_3$

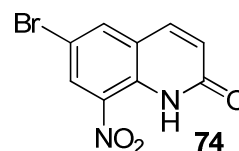
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 230 °C.

Masse Molaire : 269,05 g/mol.

HRMS (ESI-) calculée pour  $C_9H_4BrN_2O_3$   $[M-H]^-$  266,9405, trouvée 266,9402.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6,79 (dd,  $J$ = 9,7 et 2,0 Hz, 1 H, H3) ; 7,72 (d,  $J$ =9,7 Hz, 1 H, H4) ; 8,00 (d,  $J$ =2,2 Hz, 1 H, H5) ; 8,60 (d,  $J$ = 2,2 Hz, 1 H, H7) ; 11,19 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 113,4 (C) ; 123,5 (C) ; 125,0 (CH) ; 130,3 (CH) ; 132,8 (C) ; 133,3 (C) ; 137,7 (CH) ; 138,7 (CH) ; 161,0 (C).



<sup>396</sup> O. S. Tee, M. Paventi, *JACS*, 1982, *104*, 4142-4146.

**Préparation de la 3,6-dichloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **75****

Dans un ballon bicol de 50 mL, 15 mL de HCl à 37% ont été ajoutés sur 100 mg de 8-nitroquinolin-2(1H)-one **22** (0,53 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a été chauffé à 100°C avant que 280 mg de chlorate de sodium (2,63 mmol, 5 équiv.) ne soient ajoutés avec précaution (Dégagement de Cl<sub>2</sub>). Après 24 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de Cl<sub>2</sub>. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé par du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 25 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec de l'éther diéthylique. Le composé **75** a été isolé et recristallisé dans l'acétonitrile sous forme de poudre jaune avec un rendement de 56% (0,29 mmol, 76 mg).

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

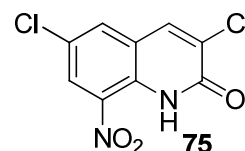
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 197-198 °C.

Masse Molaire : 259,04 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 258,9677, trouvée 258,9672.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,83 (d, J= 2,3 Hz, 1 H, H5) ; 7,93 (s, 1 H, H4) ; 8,49 (d, J= 2,3 Hz, 1 H, H7) ; 11,42 (sl, 1 H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 122,8 (C), 127,5 (CH) ; 127,7 (C) ; 130,6 (C) ; 130,9 (C) ; 133,3 (C) ; 133,9 (CH) ; 135,8 (CH) ; 157,0 (C).

**Préparation de la 6-bromo-3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **76**<sup>339</sup>**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 20 mL de HBr à 48% ont été ajoutés sur 250 mg de 3-chloro-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **25** (1,11 mmol, 1 équiv.). Le milieu réactionnel a été chauffé à 100°C avant que 700 mg de bromate de sodium (4,4 mmol, 4 équiv.) soient ajoutés avec précaution (Dégagement de Br<sub>2</sub>). Après 24 h à reflux, le milieu réactionnel a été laissé pendant 1 h sous la hotte aspirante pour évacuer les vapeurs de Br<sub>2</sub>. Le mélange réactionnel a ensuite été versé dans un bain de glace, alcalinisé

<sup>339</sup> N. J. O'Brien, M. Brzozowski, D. J. D. Wilson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3781-3790.

par du  $K_2CO_3$  et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du dichlorométhane. Le composé **76** a été isolé et recristallisé dans l'isopropanol sous forme de poudre jaune avec un rendement de 79% (0,88 mmol, 266 mg).

Formule brute :  $C_9H_4BrClN_2O_3$

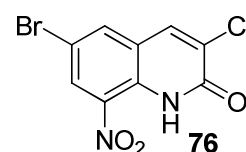
Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 232-233 °C.

Masse Molaire : 303,50 g/mol.

HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_9H_5BrClN_2O_3$   $[M+H]^+$  302,9172, trouvée 302,9169.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7,93 (s, 1 H, H4) ; 7,97 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, H5) ; 8,61 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, H7) ; 11,41 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 114,2 (C) ; 123,1 (C) ; 130,2 (CH) ; 130,5 (C) ; 131,2 (C) ; 133,3 (C) ; 135,7 (CH) ; 136,8 (CH) ; 157,0 (C).



#### Préparation de 6-bromo-3-[4-(méthoxycarbonyl)phenyl]-8-nitroquinolin-2(1H)-one **77**<sup>384</sup>

Dans un tube scellé de 25 mL, 300 mg de 3,6-dibromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **74** (0,86 mmol, 1 équiv.), 843 mg de carbonate de césium (2,6 mmol, 3 équiv.), 100 mg de  $Pd(PPh_3)_4$  (0,086 mmol, 0,1 équiv.) et 186 mg d'acide 4-(méthoxycarbonyl)phénylboronique (1,03 mmol, 1,2 équiv.) ont été ajoutés. Sous atmosphère inerte (Argon), 10 mL de diméthoxyéthane et 2 mL d'eau ont ensuite été ajoutés. Le milieu réactionnel a été chauffé à 80°C dans un réacteur micro-ondes pendant 2 h avant d'être versé dans un bécher d'eau, extrait deux fois avec du dichlorométhane (2 fois 50 mL) et deux fois avec de l'acétate d'éthyle (2 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (97/3). Le composé **77** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 56% (0,48 mmol, 195 mg).

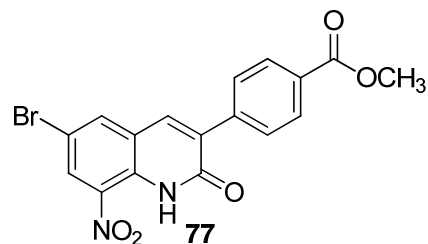
<sup>384</sup> E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 6002-6005.

Formule brute :  $C_{17}H_{11}BrN_2O_5$

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : *En cours*.

Masse Molaire : 403,18 g/mol.



HRMS (DCI  $CH_4$ ) calculée pour  $C_{17}H_{12}BrN_2O_5$   $[M+H]^+$  *En cours*, trouvée *En cours*.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : *En cours*. RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : *En cours*.

### Préparation de la 6-bromo-3-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **78**

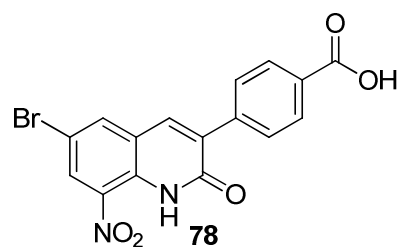
Dans un ballon bicol de 100 mL, 40 mL d'un mélange  $H_2O$ /Ethanol (2/8) ont été ajoutés à 95 mg de la 6-bromo-3-(4-carboxyméthylphényl)-8-nitroquinolin-2(1H)-one **77** (0,23 mmol, 1 équiv.). Par la suite, 47 mg de NaOH (1,18 mmol, 5 équiv.) ont été ajoutés et le milieu réactionnel a été agité à 60°C pendant 2 h. Le milieu réactionnel a ensuite été versé dans un bécher d'eau, neutralisé par du HCl à 37% et extrait trois fois avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 25 mL). La phase organique résultante a été lavée avec de l'eau à pH=1, séchée sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été lavé avec l'eau à pH=9 pour isoler les composés **78** sous forme de poudre orange avec un rendement de 98% (0,22 mmol, 88 mg).

Formule brute :  $C_{16}H_9BrN_2O_5$

Apparence : Poudre orange.

Tdec : 300 °C

Masse Molaire : 389,16 g/mol.



HRMS (ESI-) calculée pour  $C_{16}H_8BrN_2O_5$   $[M-H]^-$  386.9617, trouvée 386.9620.

RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7,90-8,06 (m, 4 H, H2', H3', H5' et H6') ; 8,40 (s, 1 H, H4) ; 8,48 (d, J=2,2 Hz, 1 H, H5) ; 8,54 (d, J=2,2 Hz, 1 H, H7) ; 11,23 (sl, 1 H, NH). RMN  $^{13}C$  (400 MHz, DMSO-



d6)  $\delta$ : 112,8 (C) ; 124,00 (C) ; 129,3 (2xCH) ; 129,6 (2xCH) ; 129,7 (CH) ; 131,3 (C) ; 132,0 (C) ; 132,8 (C) ; 134,6 (C) ; 137,9 (CH) ; 138,1 (CH) ; 139,2 (C) ; 160,2 (C) ; 167,4 (C).

### Préparation de la 3,6-(4-carboxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **79**<sup>384</sup>

Dans un tube scellé de 25 mL, 200 mg de 3,6-dibromo-8-nitroquinoléin-2(1H)-one **74** (0,57 mmol, 1 équiv.), 750 mg de carbonate de césium (3,45 mmol, 6 équiv.), 131 mg de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,114 mmol, 0,2 équiv.) et 259 mg d'acide 4-carboxyméthylphénylboronique (1,44 mmol, 2,5 équiv.) ont été ajoutés. Sous atmosphère inerte, 10 mL de diméthoxyéthane et 2 mL d'eau ont ensuite été ajoutés. Le milieu réactionnel a été chauffé à 95°C dans un réacteur micro-ondes pendant 2 h avant d'être versé dans un bécher d'eau et extrait trois fois avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (95/5). Le composé **79** a été isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 64% (0,37 mmol, 170 mg).

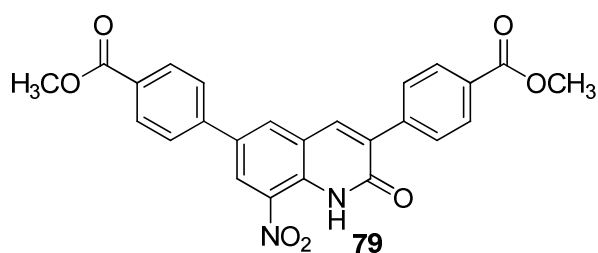
Formule brute : C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Apparence : Poudre jaune.

Point de fusion : 278 °C.

Masse Molaire : 458,43 g/mol.

HRMS (DCI CH<sub>4</sub>) calculée pour C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 459,1192, trouvée 459,1170.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,96 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 3,97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>) ; 7,73-7,75 (m, 2 H, H2'' et H6'') ; 7,85-7,89 (m, 2 H, H2' et H6') ; 8,05 (s, 1 H, H4) ; 8,14-8,16 (m, 2 H, H3'' et H5'') ; 8,18-8,21 (m, 3 H, H5, H3' et H5') ; 8,77 (d, J= 2,0 Hz, 1 H, H7) ; 11,42 (sl, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :

<sup>384</sup> E. Chong, L. L. Schafer, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 6002-6005.

52,3 (CH<sub>3</sub>) ; 52,4 (CH<sub>3</sub>) ; 123,0 (C) ; 126,2 (CH) ; 126,8 (2xCH) ; 128,7 (2xCH) ; 129,7 (2xCH) ; 130,3 (C) ; 130,6 (C) ; 130,65 (2xCH) ; 132,75 (C) ; 133,1 (C) ; 133,7 (CH) ; 134,0 (C) ; 134,0 (C) ; 137,5 (CH) ; 138,8 (C) ; 141,6 (C) ; 160,5 (C) ; 166,5 (C) et 166,6 (C).

### Préparation de la 3,6-(4-carboxyphényl)-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **80**

Dans un ballon bicol de 100 mL, 25 mL d'un mélange H<sub>2</sub>O/Ethanol (2/8) ont été ajoutés à 150 mg de la 3,6-(4-carboxyméthylphényl)-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **79** (0,33 mmol, 1 équiv.) ont été ajoutés. Par la suite, 65 mg de soude (1,63 mmol, 5 équiv.) ont été ajoutés et le milieu réactionnel a été agité à 60°C pendant 2 h. Le milieu réactionnel a ensuite été versé dans un bécher d'eau, neutralisé par du HCl à 37% et extrait trois fois avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 50 mL). La phase organique résultante a été lavée avec de l'eau à pH=1, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporée sous pression réduite. Le brut réactionnel a été lavée avec l'eau à pH=9 pour isoler le composés **80** sous forme de poudre orange foncé avec un rendement de 70% (0,16 mmol, 70 mg).

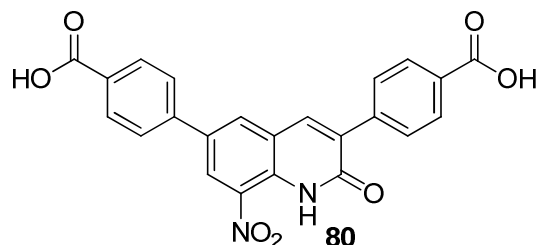
Formule brute : C<sub>23</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Apparence : Poudre orange.

Température de décomposition. 192-193 °C

Masse Molaire : 430,37 g/mol.

HRMS (ESI -) calculée pour C<sub>23</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup> 429,0723, trouvée 429,0726.



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 7,94-7,99 (m, 4H, H2', H2'', H6' et H6'') ; 8,05-8,11 (m, 4H, H3', H3'', H5' et H5'') ; 8,53 (s, 1H, H4) ; 8,71 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H5) ; 8,74 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H7) ; 11,29 (sl, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 123,0 (C) ; 125,9 (CH) ; 127,2 (2xCH) ; 129,2 (2xCH) ; 129,6 (C) ; 129,65 (2xCH) ; 130,7 (2xCH) ; 130,9 (C) ; 131,1 (C) ; 132,2 (C) ; 132,4 (C) ; 132,6 (C) ; 134,4 (CH) ; 139,1 (CH) ; 139,5 (C) ; 141,5 (C) ; 160,4 (C) ; 167,4 (C) et 167,45 (C).

### 3. Partie Biologie

#### Evaluation de l'activité antileishmanienne sur le stade amastigote axénique de *Leishmania infantum*.<sup>364</sup>

Des promastigotes de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263, CNR Montpellier Leishmania, France, exprimant la luciférase) en phase logarithmique, cultivés dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine), ont été centrifugés à 900g pendant 10 minutes. Le surnageant a été enlevé avec attention et a été remplacé avec le même volume de milieu RPMI 1640 ajusté à pH = 5,4 et incubé pendant 24 h à 24 °C. Les promastigotes acidifiés ont ensuite été incubés à 24 h à 37 °C dans une flasque ventilée. Les promastigotes ont ainsi été transformés en amastigotes axéniques. L'effet des molécules testées sur la croissance des amastigotes axéniques de *L. infantum* a été évalué comme suit. Les amastigotes ont été incubés à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans des plaques 96 puits avec diverses concentrations de produits solubilisés dans du DMSO-D6 (concentration finale inférieure à 0,5%) en duplicata. Les contrôles DMSO-D6, amphotéricine B, miltéfosine et fexinidazole (les médicaments de références ont été achetées à Sigma-Aldrich) ont été ajoutés lors de chaque expérience. Après 48 h d'incubation à 37 °C, chaque plaque a été observée au microscope afin de détecter l'éventuelle présence de précipités. Pour estimer l'activité de la luciférase des amastigotes axéniques, 80 µL de chaque puit a été transféré dans une plaque blanche de 96 puits, le réactif Steady Glow® (Promega) a été ajouté selon les recommandations du fabricant, et les plaques incubées pendant 2 minutes. La luminescence a été mesurée par le compteur de luminescence Microbeta (PerkinElmer). La concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) a été définie comme la concentration de composé requise pour inhiber 50% de l'activité métabolique des amastigotes de *L. infantum* en comparaison avec le contrôle. Les valeurs de CI<sub>50</sub> ont été calculées *via* une analyse de régression non-linéaire traitées selon des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Les valeurs de CI<sub>50</sub> représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes.

#### Evaluation de la cytotoxicité sur des lignées cellulaires HepG2.

L'évaluation de la cytotoxicité des molécules testées sur des cellules HepG2 (certifiées sans mycoplasmes, ref 85011430-1VL chez Sigma-Aldrich) a été réalisée selon la méthode de Mosman.<sup>350</sup> Des cellules (à une concentration de  $5 \times 10^4$ /mL) dans 100 µL de milieu Alpha MEM Eagle supplémenté avec du 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de *L*-glutamine et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL stréptomycine) ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et incubées à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24 h d'incubation, 100 µL de milieu avec diverses concentrations de produit et les

<sup>364</sup> C. Zhang, S. Bourgeade-Delmas, A. F. Alvarez *et al.* *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 143, 1635-1643.

<sup>350</sup> T. J. Mosman, *Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63

contrôles appropriés ont été ajoutés et les plaques incubées pendant 72 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Chaque plaque a ensuite été examinée au microscope afin d'observer l'éventuelle formation de précipités avant que le milieu ne soit aspiré de ces puits. 100 µL d'une solution de MTT à 0,5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puit et les cellules incubées pendant 2 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après ce temps, la solution de MTT a été aspirée de chaque puit et 100 µL de DMSO-D6 a été ajouté dans chacun d'entre eux pour solubiliser les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 570 nm sur un spectrophotomètre Eon BioTek. Le DMSO-D6 a été utilisé comme blanc et la doxorubicine comme contrôle positif. Les CC<sub>50</sub> ont été calculées par une analyse de régression non linéaire sur des courbes dose-réponse, en utilisant le logiciel TableCurve 2D V5. Elles représentent la valeur moyenne calculées depuis 3 expériences réalisées indépendamment.

### **Evaluation de la génotoxicité *via* un test des comètes.**

Le test des comètes a été utilisé pour détecter les cassures d'ADN et les sites alcali-labiles. Des cellules HepG2 trypsinées ont été incorporées dans de l'agarose à 0,7% à point de fusion de bas (Sigma-Aldrich) et déposées sur du film de polyester pré-découpé (film Gelbond®) pour réaliser des mini-dépôts comme décrit précédemment.<sup>354</sup> Le film a ensuite été placé dans une solution de lyse (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 M, Tris 10 mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO-D6, pH 10) pendant 18 h à 4°C. L'électrophorèse (avec une solution contenant du NaOH à 0,3M, du Na<sub>2</sub>EDTA à 1 mM, pH >13) a été réalisée pendant 24 minutes dans un réservoir avec une alimentation de 28V (soit 0,8 V/cm). Après l'électrophorèse, le film a été immergé pendant 2x 5 min dans du PBS pour le neutraliser, suivi d'une fixation dans de l'éthanol pendant 1,5 h et d'un séchage. Après coloration avec du SYBR® Gold à une dilution de x10 000 pendant 20 minutes, les films ont été observés à un grossissement de x20 *via* un microscope d'épifluorescence équipé d'une plateforme automatisée Nikon, d'une caméra DS-Q1Mc et du logiciel de capture automatique d'images Nikon NiS Element Advanced Research. Dans ces images, pour chaque cellule, le niveau de dommages sur l'ADN a été évalué par un système semi-automatique de score, par la mesure de l'intensité des pixels de la queue divisée par l'intensité totale des pixels de la tête et de la queue de la comète, au moyen du logiciel « Lucia Comet Assay » (Laboratory Imaging, Prague, République Tchèque). 50 cellules par dépôts et 4 dépôts par échantillon ont été analysés. La médiane de ces 200 valeurs a été calculée et appelée % d'ADN dans la queue.

---

<sup>354</sup> H. Perdrey, K. B. Gutzkow, M. Chevalier *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2018, DOI : 10.1002/em.22204.

## Conclusion Générale et Perspectives

Les kinétoplastidés sont des parasites protozoaires flagellés responsables de maladies tropicales négligées telles que les leishmanioses et les trypanosomiasés. Ces maladies, endémiques dans plus de 150 pays, affectent plus particulièrement les personnes démunies vivant dans les régions tropicales et subtropicales. Parmi ces maladies infectieuses, la leishmaniose viscérale (*Leishmania donovani* et *Leishmania infantum*), la trypanosomiasé humaine africaine (*Trypanosoma brucei sp*) et la maladie de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) sont les plus sévères, à l'origine de plus de 40.000 décès chaque année. A ce jour, il y a peu de médicaments disponibles sur le marché pour le traitement de ces maladies parasitaires, ces médicaments étant par ailleurs mal tolérés à cause de nombreux effets indésirables dus à leur toxicité. De surcroit, la plupart de ces médicaments ne sont pas utilisables par voie orale, ce qui rend leur administration complexe et couteuse. Le manque de considération et d'investissements de la part de la communauté internationale, notamment des grands groupes pharmaceutiques, est à l'origine du terme de « Maladies tropicales négligées » (MTN). Malgré le travail du « Drugs for Neglected Diseases initiative » (DNDi), le principal consortium qui développe de nouveaux traitements contre ces MTN, seules deux nouvelles entités chimiques sont actuellement en essais cliniques. En outre l'apparition de résistances à certaines molécules accroît le besoin de développer de nouvelles substances actives aux mécanismes d'action novateurs.

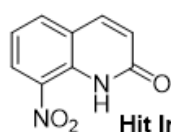
Afin d'encadrer le développement de nouvelles entités chimiques antiparasitaires, un consortium composé de TB Alliance, de DNDi et de Medecines for Malaria Venture a proposé une liste de critères qui définissent une molécule « hit » et une molécule « lead » contre ces maladies parasitaires. Un « hit » est ainsi défini comme une molécule qui présente une  $CI_{50} < 10 \mu M$ , un index de sélectivité par rapport à une lignée humaine  $> 10$ , une bonne stabilité en présence de microsomes hépatiques ainsi que des études préliminaires de RSA. Un « lead » est notamment défini par des paramètres *in vivo* : une diminution de la parasitémie d'au moins 70% sans observation de toxicité aiguë, un index de sélectivité  $> 100$ , une absence de génotoxicité tout comme une faible interaction avec les CYP450 et le canal hERG.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de la découverte d'un nouveau pharmacophore antileishmanien au sein du laboratoire, lors d'un criblage d'une bibliothèque de nitroquinoléines sur la forme promastigote de *Leishmania donovani* : la 8-nitroquinoléin-2(1H)-one. Néanmoins, de nombreux paramètres restaient à étudier en vue de mieux comprendre ce pharmacophore nitroaromatique et de générer de nouveaux hits plus puissants. En outre, aucune donnée relative au spectre antiparasitaire, au potentiel de réduction, aux propriétés génotoxiques ou pharmacocinétiques de ce pharmacophore n'était disponible.

Dans le chapitre 3, notre premier objectif a été consacré à l'étude des RSA. Formulant l'hypothèse que les molécules de cette série étaient bioactivées par les nitroréductases parasitaires, nous avons choisi une approche rationnelle alliant synthèse organique et mesure des potentiels de réduction de nouveaux dérivés. A cet effet, 35 nouvelles molécules ont été synthétisées, synthèse guidée par une étude de chimie théorique basée sur des méthodes de calcul *ab initio*. Ainsi, la modification de la partie pyridone du pharmacophore a été réalisée à partir de 2-chloroquinoléines tandis que de la partie benzénique du pharmacophore a fait appel à des synthèses utilisant des nitroanilines comme substrats. L'influence de l'interaction entre le motif lactame et le groupement nitro en position 8 du pharmacophore a également été étudiée *via* la synthèse de molécules non nitrées, d'analogues *O*-méthylés, de dérivés nitrés en position 5 ou 6 du noyau et de composés possédant une fonction amide extracyclique en position *alpha* du groupement nitro.

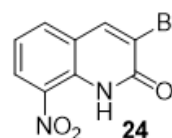
L'étude électrochimique des molécules de cette série a permis d'observer que l'introduction d'un substituant sur la partie pyridone du pharmacophore semble avoir plus d'effet sur le potentiel de réduction (correspondant au couple  $\text{NO}_2/\text{NO}_2^{\bullet-}$ ) lorsqu'elle est réalisée en position 3 qu'en position 4. Sur la partie benzénique, si la substitution de la position 6 a peu d'effet sur le potentiel de réduction, l'introduction de groupements électrodonneurs aux positions 5 et 7 est à l'origine d'une diminution significative de ces potentiels. Par ailleurs, la réaction de méthylation de la 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **22** résulte en un analogue *O*-méthylé **23** au potentiel de réduction beaucoup moins élevé (respectivement -0,54 V et -0,93 V). L'analyse par diffraction des rayons X de la molécule **22** a ainsi révélé l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'hydrogène du motif lactame et l'atome d'oxygène du groupement nitro. Cette liaison hydrogène appauvrit le cycle nitroaromatique en électrons, entraînant une augmentation des potentiels de réduction de 0,3 V. Cette étude électrochimique a également révélé l'existence d'un seuil de potentiel de réduction séparant les molécules actives ( $E^\circ > -0,58$  V) des molécules inactives ( $E^\circ < -0,58$  V). L'introduction d'un atome de brome en position 3 du pharmacophore a permis l'identification d'un nouveau hit antikinétoplastidés **24** avec des  $\text{CI}_{50}$  sur la forme amastigote axénique de *Leishmania infantum* et sur la forme trypomastigote de *Trypanosoma brucei brucei* de respectivement 7,1  $\mu\text{M}$  et 1,9  $\mu\text{M}$ . Sa faible cytotoxicité sur la lignée humaine HepG2 lui confère des index de sélectivité sur ces deux parasites de 13 et 48. Cependant, la molécule **24** s'est révélée moyennement active sur la forme amastigote intramacrophagique de *L. donovani*. Par ailleurs, cette molécule est sélectivement bioactivée par les nitroréductases de type I de *Leishmania donovani* et de *Trypanosoma brucei brucei*. Enfin, bien que mutagène au test d'Ames, la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24** n'est pas génotoxique sur des cellules humaines au test des comètes et sa bonne stabilité microsomale ( $t_{1/2} > 40$  min) tout comme son taux de fixation à l'albumine (92%) en font un bon candidat pour une évaluation *in vivo* sur un modèle murin de trypanosomiase.

## Chapitre 3

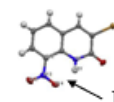


Hit Initial

CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. axé.	= 15,5 µM (IS = 10,5)
CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> pro.	= 6,6 µM (IS = 25)
CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> ama. intraM	= 6,5 µM (IS = 25)
CC <sub>50</sub> HepG2	= 164 µM



24



Liaison H

$$E^0 = -0,45 \text{ V}$$

CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. axé.	= 7,1 µM (IS = 13)
CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> pro.	= 5,9 µM (IS = 16)
CI <sub>50</sub> <i>L. dono.</i> ama. intraM	= 18 µM (IS = 5)
CI <sub>50</sub> <i>T. b. b.</i> trypoma.	= 1,9 µM (IS = 48)
CC <sub>50</sub> HepG2	= 92 µM
Test d'Ames / Test des comètes	Mutagène / Non génotoxique
Stabilité microsomale	T <sub>1/2</sub> > 40 min
Fixation à l'albumine	92%
Bioactivation NTR	NTRI

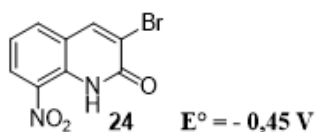
Selon les critères qui définissent une molécule « hit », la molécule **24** est un hit anti-*Trypanosoma brucei brucei* tandis qu'elle n'est pas suffisamment active sur la forme amastigote intramacrophagique pour être considérée comme une molécule « hit » antileishmanienne.

Le travail de pharmacomodulation en position 3 de ce pharmacophore a ensuite été poursuivi *via* l'introduction d'autres groupements volumineux qui semblent favoriser une bonne activité antikinétoplastidés. Après une optimisation des conditions réactionnelles, 26 nouvelles molécules ont été synthétisées *via* des couplages pallado-catalysés de Suzuki-Miyaura et de Sonogashira à partir de la 3-bromo-8-nitroquinoléin-2(1*H*)-one **24**. La réaction de couplage de Sonogashira entre la molécule **24** et le phénylacétylène a mené à la synthèse du produit de couplage attendu **60** mais également à la furo(2,3-*b*)quinoléine **61**. L'instabilité du dérivé **60** et la faible solubilité aqueuse de **61** nous ont incité à ne pas donner suite au développement de cette série. La réaction de couplage de Suzuki-Miyaura a mené à la synthèse de 24 molécules originales. Une analyse électrochimique de ces dérivés a révélé que l'introduction d'un groupement phényle en position 3 n'a que peu d'effet sur le potentiel de réduction de ces molécules. Cette série de dérivés a montré une faible hydrosolubilité, généralement seules les molécules substituées par un groupement hydrophile (hydroxyméthyle et aldéhyde) ou ionisable (acide carboxylique) ont pu être évaluées *in vitro*. L'évaluation antiparasitaire des molécules de cette série a permis d'identifier un nouveau hit sélectif anti-*Trypanosoma* **56**. En effet, l'introduction d'un groupement *para*-carboxyphényle en position 3 du noyau a induit une perte d'activité antileishmanienne tout en conservant le même niveau d'activité anti-*Trypanosoma* que celui de la molécule **24**. Par ailleurs, la cytotoxicité de la molécule **56** a été améliorée par rapport à celle de la molécule **24** ce qui se traduit par un index de sélectivité augmenté. Étonnamment, l'analogue *O*-méthylé **59** de la molécule **56** est actif sur *L. infantum* tout comme sur *T. b. brucei*. De plus, la molécule **56** n'est que partiellement bioactivée par la NTR de *Trypanosoma*. Ainsi, la sélectivité d'action antiparasitaire de la molécule **56**, l'activité antileishmanienne de son analogue *O*-méthylé **59** et la bioactivation partielle par la nitroréductase de *Trypanosoma* nous interroge sur l'existence d'un nouveau mécanisme d'action pour les molécules de cette série. Enfin un test de franchissement de la barrière hémato-encéphalique a

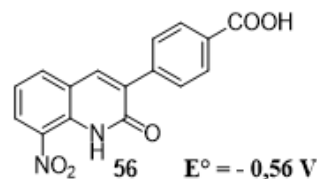


démontré une faible diffusion membranaire de la molécule **56**, élément défavorable à développement comme agent anti-*Trypanosoma brucei*, le stade 2 de la THA étant méningo-encéphalique.

### Chapitre 4



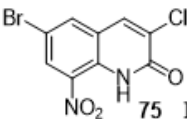
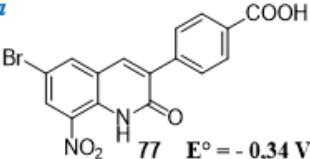
$CI_{50}$  *L. inf. ama. axé.* = **7,1  $\mu\text{M}$  (IS = 13)**  
 $CI_{50}$  *T. b. b. trypoma.* = **1,9  $\mu\text{M}$  (IS = 48)**  
 $CC_{50}$  HepG2 = **92  $\mu\text{M}$**   
 Bioactivation NTR = **NTR1**



$CI_{50}$  *L. inf. ama. axé.* > **100  $\mu\text{M}$**   
 $CI_{50}$  *T. b. b. trypoma.* = **1,5  $\mu\text{M}$  (IS = 80)**  
 $CC_{50}$  HepG2 = **120  $\mu\text{M}$**   
 Bioactivation NTR = **Partielle par NTR1**  
 Franchissement BHE = **Ne diffuse pas**

Des travaux de pharmacochimie en position 6 du pharmacophore ont alors été effectués, cette position semblant présenter un intérêt particulier dans le développement de molécules aux propriétés anti-*Trypanosoma*, comme le suggèrent les données de RSA mises à jour dans le chapitre 3. Une série de 19 molécules substituées en position 6 par un groupement électroattracteur (trifluorométhyle ou atome d'halogène) et en position 3 par les meilleurs groupements identifiés lors des études précédentes a alors été synthétisée. Au cours de ces travaux de synthèse, la mise au point des réactions d'halogénéation sélective en position 3 ou de dihalogénéation en positions 3 et 6 du pharmacophore ainsi ont été réalisées. Grâce à la préparation des dérivés 3,6-dibromés, les réactions de couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura, sélective en position 3 ou symétrique en position 3 et 6, ont été rendues possibles. L'évaluation biologique de ces nouveaux dérivés a permis l'identification de deux nouveaux hits anti-*Trypanosoma*. L'association d'un atome de brome en position 6 et d'un atome de chlore ou d'un groupement *para*-carboxyphényle en position 3 a mené aux dérivés **75** et **77** qui présentent des activités antileishmaniennes similaires à la molécule **24** mais qui témoignent d'excellentes activités anti-*Trypanosoma*, avec des  $CI_{50}$  variant de 0,012 à 0,06  $\mu\text{M}$  sur la forme trypomastigote de *T. b. brucei*. Ces molécules sont donc particulièrement puissantes, leurs cytotoxicités respectives ( $CC_{50}$ =17,9 et 60,4  $\mu\text{M}$ ) leur conférant des index de sélectivité de 1491 et 1007, inférieurs à celui de la suramine (>3333) mais plus élevés que celui du fexinidazole (> 500) et très largement supérieurs à celui de l'eflornithine (>6), médicament de référence contre la THA. Par ailleurs, ces deux molécules sont stables en présence de microsomes hépatiques ( $t_{1/2}$  > 40 min) et ne sont pas génotoxiques. Ces deux molécules se différencient cependant au niveau de deux paramètres : la bioactivation par les nitroréductases et le franchissement de la barrière hémato-encéphalique. En effet la molécule **75** est un substrat de la NTR1 de *L. donovani* et diffuse à travers le modèle *in vitro* de la BHE. *A contrario*, la molécule **77** est partiellement bioactivée par la NTR1 de *L. donovani* et ne diffuse que partiellement à travers la BHE. Par ailleurs, les tests de bioactivation sur la NTR de *Trypanosoma* sont actuellement en cours. Si ces deux molécules ne peuvent pas être considérées comme des hits antileishmaniens en raison de l'absence de test sur la forme amastigote intramacrophagique, ce sont donc des candidats potentiels prometteurs en tant que

hits anti-*Trypanosoma*. Il nous faut à présent tester ces deux composés *in vivo* afin d'évaluer leur potentiel pharmaceutique en tant que molécules « lead ».

<p><b>Chapitre 5</b> <b>Hits anti-<i>Trypanosoma</i></b></p>			
 <p><b>75</b> <math>E^\circ = -0,37 \text{ V}</math></p>		 <p><b>77</b> <math>E^\circ = -0,34 \text{ V}</math></p>	
CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. axé.	= 6,7 $\mu\text{M}$ (IS = 2,7)	CI <sub>50</sub> <i>L. inf.</i> ama. axé.	= 8,0 $\mu\text{M}$ (IS = 7,5)
CI <sub>50</sub> <i>T. b. b.</i> trypanoma.	= 0,012 $\mu\text{M}$ (IS = 1500)	CI <sub>50</sub> <i>T. b. b.</i> trypanoma.	= 0,06 $\mu\text{M}$ (IS = 1007)
CC <sub>50</sub> HepG2	= 18 $\mu\text{M}$	CC <sub>50</sub> HepG2	= 60 $\mu\text{M}$
Test des comètes	Non génotoxique	Test des comètes	Non génotoxique
Stabilité microsomale	T <sub>1/2</sub> > 40 min	Stabilité microsomale	T <sub>1/2</sub> > 40 min
Fixation à l'albumine	> 99%	Fixation à l'albumine	> 99%
Bioactivation NTR <i>L. dono</i>	NTRI	Bioactivation NTR <i>L. dono</i>	Partielle par NTRI
Bioactivation NTR <i>T. b. brucei</i>	En attente	Bioactivation NTR <i>T. b. brucei</i>	En attente
Franchissement BHE	Diffuse	Franchissement BHE	Diffuse moyennement

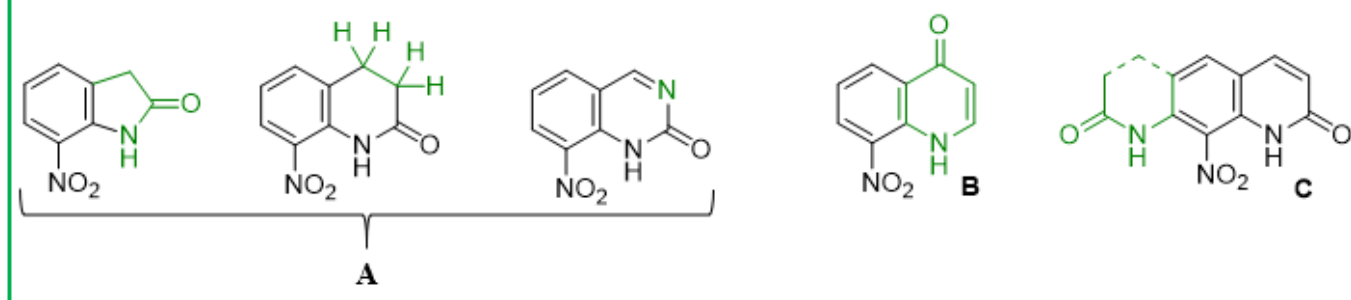
Ce travail de thèse ouvre de nombreuses perspectives. En effet, si les activités sur *Trypanosoma* des molécules **75** et **77** sont très encourageantes, ces molécules montrent également une cytotoxicité améliorée, avec des CC<sub>50</sub> de 18 et 60  $\mu\text{M}$ .

- 1) Afin d'étendre l'étude pharmacophorique sur la partie pyridone et d'essayer de réduire la cytotoxicité des molécules de cette série, nous pourrions envisager la synthèse de différentes nouvelles molécules. En effet, les molécules en série 8-nitroquinoléin-2(1*H*)-ones comprennent un motif accepteur de Michael (motif acrylamide), dont les propriétés électrophiles pourraient présenter un caractère cytotoxique notamment *via* l'interaction avec divers bionucléophiles cellulaires. La synthèse de dérivés de nitroquinazolin-2(1*H*)-one, de nitroindole-2(1*H*)-one ou de 3,4-dihydro-nitroquinoléin-2(1*H*)-one pourrait être envisagée dans la conception d'analogues dépourvus de ce motif acrylamide.

Par ailleurs, il serait également intéressant de synthétiser un dérivé de quinoléin-4(1*H*)-one (molécule **B**) en vue de statuer sur la nécessité de la présence du motif lactame ou sur la possibilité de préserver l'activité anti-*Trypanosomatidae* grâce à d'autres donneurs de liaison hydrogène intramoléculaire, comme le motif aminé de la molécule **B**.

Enfin, la synthèse d'une molécule possédant un second motif amide en position *alpha* prime du groupement nitro (molécule **C**) nous permettrait d'étudier l'influence éventuelle d'une seconde liaison hydrogène intramoléculaire vis-à-vis du potentiel de réduction et de l'activité antiparasitaire.

## Poursuite de l'étude du pharmacophore



- 2) Au cours de ce travail de thèse, il est apparu que l'introduction de substituants en positions 3 et 6 du pharmacophore permet de concevoir de puissantes molécules anti-*Trypanosoma*. Cependant, la présence notamment d'un atome de brome en position 6 de la structure mène à des dérivés sensiblement plus cytotoxiques. Sur la base de ces résultats, afin de remplacer cet atome de brome en position 6 avec pour objectif d'améliorer le profil de cytotoxicité des dérivés de cette série, il serait possible d'y introduire un groupement (hétéro)aryle *via* un double couplage de Suzuki-Miyaura dissymétrique (molécule **D**). Par ailleurs, la 6-bromo-8-nitro-3-(4-carboxyphényl)quinoléin-2(1H)-one 78 fait partie des molécules les plus actives sur *Trypanosoma* dans cette série. Le remplacement de l'atome de brome par un groupement trifluorométhyle (molécule **E**) ou par un atome de chlore (molécule **F**) pourrait être un autre moyen d'améliorer le profil de cytotoxicité de cette molécule.

Enfin, une dernière possibilité visant à tenter de réduire la cytotoxicité de ces molécules pourrait être l'introduction de groupements (hétéro)aryles (molécule **G**) ou alcynyles (molécule **H**) en position 6 du pharmacophore *via* des réactions pallado-catalysées de Suzuki-Miyaura et Sonogashira. Cependant, ce nouveau travail de pharmacochimie doit également être guidé par la volonté de synthétiser des molécules aux faibles poids moléculaires, préférablement inférieurs à 400 g/mol, conditionnant le bon passage à travers la barrière hémato-encéphalique.<sup>397, 391</sup>

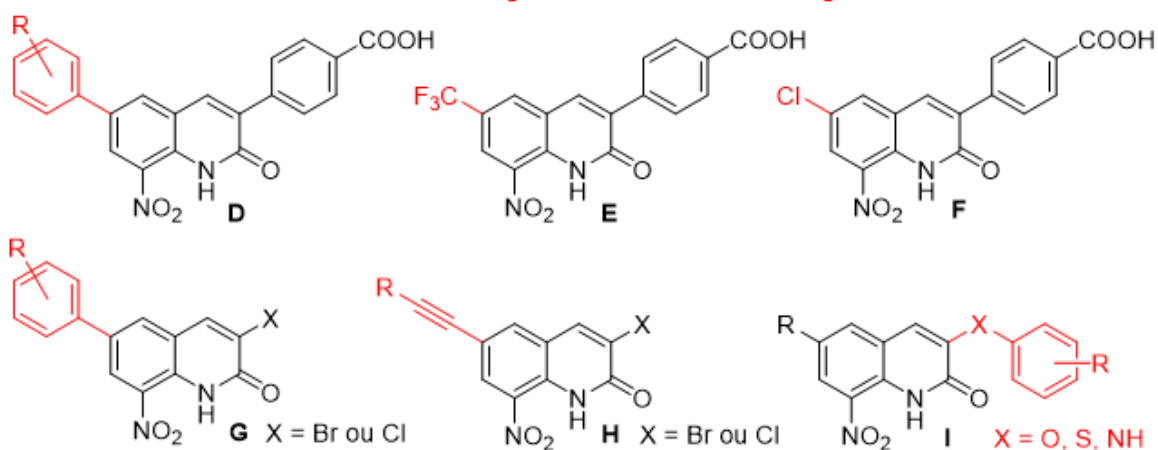
- 3) D'autre part, avec comme objectif de poursuivre l'étude des RSA en position 3, l'introduction de motifs phénol, thiophénol ou aniline serait intéressante à explorer (molécule **I**). Pour synthétiser ces molécules et introduire une aniline en position 3 du cycle *via* un couplage de Buchwald-Hartwig, la protection de l'atome d'azote du motif lactame apparaît indispensable à la lumière des données bibliographiques sur la synthèse de ce type de dérivés.
- 4) Pour finir, l'évaluation biologique de toutes ces molécules sera réalisée prochainement sur *Trypanosoma cruzi* par Mr Jean-Yves Brossas au centre d'Immunologie et des Maladies infectieuses (CIMI, UPMC UMRS CR7, Paris), dans l'équipe dirigée par le Pr Dominique Mazier. L'objectif est d'appréhender le spectre antiparasitaire complet de cette série de

<sup>397</sup> P. Naik et L. Cucullo, *J. Pharm. Sci.*, **2012**, 101, 1337-1354.

<sup>391</sup> H. Van de Waterbeemd, G. Camenisch, G. Folkers, *et al.*, *J. Drug Target*, **1998**, 6, 151-165.

molécule *via* des tests sur le parasite responsable de la maladie de Chagas, responsable de plus de 12.000 décès chaque année. De surcroît, cette maladie attaque également le bétail en Amérique du Sud, ce qui représente un enjeu socio-économique de tout premier plan pour les paysans de ces pays endémiques qui tirent leurs revenus de l'élevage. Le développement d'une molécule d'intérêt humain et vétérinaire pourrait ainsi être un moyen de susciter l'intérêt de la communauté industrielle pharmaceutique et lever les fonds nécessaires au développement de nouvelles molécules ciblant les MTN.

### Poursuite des études de pharmacomodulation en positions 3 et 6



## Bibliographie

- (1) Smith, J.; Taylor, E. M. What Is Next for NTDs in the Era of the Sustainable Development Goals? *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10* (7), e0004719.
- (2) Trouiller, P.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. Drug Development for Neglected Diseases: A Deficient Market and a Public-Health Policy Failure. *The Lancet* **2002**, *359* (9324), 2188–2194.
- (3) Jackson, Y.; Stephenson, N. Neglected Tropical Disease and Emerging Infectious Disease: An Analysis of the History, Promise and Constraints of Two Worldviews. *Global Public Health* **2014**, *9* (9), 995–1007.
- (4) Baker, M.; Mathieu, E.; Fleming, F.; Deming, M.; King, J.; Garba, A.; Koroma, J.; Bockarie, M.; Kabore, A.; Sankara, D.; et al. Mapping, Monitoring, and Surveillance of Neglected Tropical Diseases: Towards a Policy Framework. *The Lancet* **2010**, *375* (9710), 231–238.
- (5) Conteh, L.; Engels, T.; Molyneux, D. H. Socioeconomic Aspects of Neglected Tropical Diseases. *The Lancet* **2010**, *375* (9710), 239–247.
- (6) Rapport OMS, **2013**, Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/).
- (7) Conférence OMS, 2011, Interagency meeting on planning the prevention and control of neglected and zoonotic diseases (NZDs), 5-6 Juillet, Genève, Suisse, [oie.int/doc/ged/D11558.pdf](http://oie.int/doc/ged/D11558.pdf).
- (8) Murray, C. J. L.; Vos, T.; Lozano, R.; Naghavi, M.; Flaxman, A. D.; Michaud, C.; Ezzati, M.; Shibuya, K.; Salomon, J. A.; Abdalla, S.; et al. Disability-Adjusted Life Years (DALYs) for 291 Diseases and Injuries in 21 Regions, 1990–2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* **2012**, *380* (9859), 2197–2223.
- (9) Hotez, P. J.; Alvarado, M.; Basáñez, M.-G.; Bolliger, I.; Bourne, R.; Boussinesq, M.; Brooker, S. J.; Brown, A. S.; Buckle, G.; Budke, C. M.; et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2014**, *8* (7), e2865.
- (10) Winkler, A. S.; Klohe, K.; Schmidt, V.; Haavardsson, I.; Abraham, A.; Prodjinotho, U. F.; Ngowi, B.; Sikasunge, C.; Noormahomed, E.; Amuasi, J.; et al. Neglected Tropical Diseases – the Present and the Future. *Tidsskrift for Den norske legeforening* **2018**.
- (11) Hotez, P.; Aksoy, S. PLOS Neglected Tropical Diseases: Ten Years of Progress in Neglected Tropical Disease Control and Elimination ... More or Less. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2017**, *11* (4), e0005355.
- (12) Rapport OMS, 2012, Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases, a Road Map for Implantation, <http://www.emro.who.int/neglected-tropical-diseases/ntd-infocus/ntd-roadmap.html>.
- (13) OMS, 2007, Report of the first global partner's meeting on neglected tropical diseases: a turning point, [http://www.who.int/neglected\\_diseases/partners\\_meeting/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/partners_meeting/en/).
- (14) Buscaglia, C. A.; Kissinger, J. C.; Agüero, F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. *Trends in Genetics* **2015**, *31* (10), 539–555.
- (15) Molyneux, D. H. The “Neglected Tropical Diseases”: Now a Brand Identity; Responsibilities, Context and Promise. *Parasites & Vectors* **2012**, *5* (1), 23.
- (16) Bush, S.; Hopkins, A. D. Public–Private Partnerships in Neglected Tropical Disease Control: The Role of Nongovernmental Organisations. *Acta Tropica* **2011**, *120*, S169–S172.
- (17) Mackey, T. K.; Liang, B. A.; Cuomo, R.; Hafen, R.; Brouwer, K. C.; Lee, D. E. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: A Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. *Clinical Microbiology Reviews* **2014**, *27* (4), 949–979.
- (18) Molyneux, D. H. Neglected Tropical Diseases: Now More than Just ‘Other Diseases’— the Post-2015 Agenda. *International Health* **2014**, *6* (3), 172–180.
- (19) Webster, J. P.; Molyneux, D. H.; Hotez, P. J.; Fenwick, A. The Contribution of Mass Drug Administration to Global Health: Past, Present and Future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2014**, *369* (1645), 20130434–20130434.
- (20) Molyneux, D. H. Neglected Tropical Diseases: Now More than Just ‘Other Diseases’— the Post-2015 Agenda. *International Health* **2014**, *6* (3), 172–180.
- (21) Nayyar, G. M.; Breman, J. G.; Newton, P. N.; Herrington, J. Poor-Quality Antimalarial Drugs in Southeast Asia and Sub-Saharan Africa. *The Lancet Infectious Diseases* **2012**, *12* (6), 488–496.
- (22) Molyneux, D. H.; Dean, L.; Adekeye, O.; Stothard, J. R.; Theobald, S. The Changing Global Landscape of Health and Disease: Addressing Challenges and Opportunities for Sustaining Progress towards Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases (NTDs). *Parasitology* **2018**, 1–8.

- (23) Integrating neglected tropical diseases in global health and development.
- (24) Coleman, M.; Foster, G. M.; Deb, R.; Pratap Singh, R.; Ismail, H. M.; Shivam, P.; Ghosh, A. K.; Dunkley, S.; Kumar, V.; Coleman, M.; et al. DDT-Based Indoor Residual Spraying Suboptimal for Visceral Leishmaniasis Elimination in India. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (28), 8573–8578.
- (25) Tirados, I.; Esterhuizen, J.; Kovacic, V.; Mangwiro, T. N. C.; Vale, G. A.; Hastings, I.; Solano, P.; Lehane, M. J.; Torr, S. J. Tsetse Control and Gambian Sleeping Sickness; Implications for Control Strategy. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2015**, *9* (8), e0003822.
- (26) Rosecrans, K.; Cruz-Martin, G.; King, A.; Dumonteil, E. Opportunities for Improved Chagas Disease Vector Control Based on Knowledge, Attitudes and Practices of Communities in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2014**, *8* (3), e2763.
- (27) Hemingway, J.; Ranson, H.; Magill, A.; Kolaczinski, J.; Fornadel, C.; Gimnig, J.; Coetzee, M.; Simard, F.; Roch, D. K.; Hinzoumbe, C. K.; et al. Averting a Malaria Disaster: Will Insecticide Resistance Derail Malaria Control? *The Lancet* **2016**, *387* (10029), 1785–1788.
- (28) OMS, 2017, Global Vector Control Response 2017–2030, Genève, Suisse, <http://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/>.
- (29) AVMA, 2009, One health: A new professional imperative, Schaumburg, Etats-Unis, [https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth\\_final.pdf](https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf).
- (30) Welburn, S. C.; Beange, I.; Ducrotoy, M. J.; Okello, A. L. The Neglected Zoonoses—the Case for Integrated Control and Advocacy. *Clinical Microbiology and Infection* **2015**, *21* (5), 433–443.
- (31) Hotez, P. J. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. In *Advances in Parasitology*; Elsevier, 2018; Vol. 100, pp 29–38.
- (32) Molyneux, D. H.; Savioli, L.; Engels, D. Neglected Tropical Diseases: Progress towards Addressing the Chronic Pandemic. *The Lancet* **2017**, *389* (10066), 312–325.
- (33) Hotez, P. J. Neglected Tropical Diseases in the Anthropocene: The Cases of Zika, Ebola, and Other Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10* (4), e0004648.
- (34) Connors, E. E.; Vinetz, J. M.; Weeks, J. R.; Brouwer, K. C. A Global Systematic Review of Chagas Disease Prevalence among Migrants. *Acta Tropica* **2016**, *156*, 68–78.
- (35) 14-0928.FinalEXP.Pdf.
- (36) *Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases*; World Health Organization, Ed.; World Health Organization: Geneva, 2015.
- (37) Booth, M.; Clements, A. Neglected Tropical Disease Control – The Case for Adaptive, Location-Specific Solutions. *Trends in Parasitology* 2018, *34* (4), 272–282.
- (38) *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*; TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Weltgesundheitsorganisation, Eds.; WHO technical report series; World Health Organization: Geneva, 2012.
- (39) Bethony, J. M.; Cole, R. N.; Guo, X.; Kamhawi, S.; Lightowlers, M. W.; Loukas, A.; Petri, W.; Reed, S.; Valenzuela, J. G.; Hotez, P. J. Vaccines to Combat the Neglected Tropical Diseases: NTD Vaccines. *Immunological Reviews* **2011**, *239* (1), 237–270.
- (40) Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. den; the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e35671.
- (41) Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. Leishmaniasis: A Review. *F1000Research* **2017**, *6*, 750.
- (42) <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- (43) <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
- (44) Pace, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection* **2014**, *69*, S10–S18.
- (45) Maroli, M.; Feliciangeli, M. D.; Bichaud, L.; Charrel, R. N.; Gradoni, L. Phlebotomine Sandflies and the Spreading of Leishmaniasis and Other Diseases of Public Health Concern. *Medical and Veterinary Entomology* **2013**, *27* (2), 123–147.
- (46) Aspöck, H.; Gerersdorfer, T.; Formayer, H.; Walochnik, J. Sandflies and Sandfly-Borne Infections of Humans in Central Europe in the Light of Climate Change. *Wiener klinische Wochenschrift* **2008**, *120* (S4), 24–29.
- (47) Zulfiqar, B.; Shelper, T. B.; Avery, V. M. Leishmaniasis Drug Discovery: Recent Progress and Challenges in Assay Development. *Drug Discovery Today* **2017**, *22* (10), 1516–1531.
- (48) Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS*



- Neglected Tropical Diseases* **2016**, 10 (3), e0004349.
- (49) Pratlong, F.; Floeter-Winter, L.; Ishikawa, E.; El Baidouri, F.; Ravel, C.; Dedet, J.-P.; Shaw, J. Characterization of Leishmania (Leishmania) Waltoni n.Sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2015**, 93 (3), 552–558.
  - (50) Steverding, D. The History of Leishmaniasis. *Parasites & Vectors* **2017**, 10 (1).
  - (51) Kaszak, I.; Planellas, M.; Dworecka-Kaszak, B. Canine Leishmaniosis – an Emerging Disease. *Ann. Parasitol.* **2015**, 61 (2), 8.
  - (52) Ribeiro, R. R.; Michalick, M. S. M.; da Silva, M. E.; dos Santos, C. C. P.; Frézard, F. J. G.; da Silva, S. M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International* **2018**, 2018, 1–12.
  - (53) Bern, C.; Maguire, J. H.; Alvar, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2008**, 2 (10), e313.
  - (54) Bates, P. A. Leishmania Sand Fly Interaction: Progress and Challenges. *Current Opinion in Microbiology* **2008**, 11 (4), 340–344.
  - (55) Kamhawi, S. Phlebotomine Sand Flies and Leishmania Parasites: Friends or Foes? *Trends in Parasitology* **2006**, 22 (9), 439–445.
  - (56) Hommel, M. Visceral Leishmaniasis: Biology of the Parasite. *Journal of Infection* **1999**, 39 (2), 101–111.
  - (57) Gupta, S. Visceral Leishmaniasis: Experimental Models for Drug Discovery. *INDIAN J MED RES* **2011**, 13.
  - (58) Showler, A. J.; Boggild, A. K. Cutaneous Leishmaniasis in Travellers: A Focus on Epidemiology and Treatment in 2015. *Current Infectious Disease Reports* **2015**, 17 (7).
  - (59) Machado, P. R. L.; Rosa, M. E. A.; Guimarães, L. H.; Prates, F. V. O.; Queiroz, A.; Schriefer, A.; Carvalho, E. M. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases* **2015**, 61 (6), 945–949.
  - (60) Reithinger, R.; Dujardin, J.-C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infectious Disease* **2007**, 7, 581–596.
  - (61) Guerra, J. A. de O.; Prestes, S. R.; Silveira, H.; Coelho, L. I. de A. R. C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M. das G. V.; Ferreira, L. C. de L. Mucosal Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) Braziliensis and Leishmania (Viannia) Guyanensis in the Brazilian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2011**, 5 (3), e980.
  - (62) Marsden, P. D.; Nonata, R. R. Mucocutaneous Leishmaniasis: A Review of Clinical Aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **1975**, 9 (6), 309–326.
  - (63) Ashkan, M. M.; Rahim, K. M. Visceral Leishmaniasis in Paediatrics: A Study of 367 Cases in Southwest Iran. *Tropical Doctor* **2008**, 38 (3), 186–188.
  - (64) Collin, S.; Davidson, R.; Ritmeijer, K.; Keus, K.; Melaku, Y.; Kipnetich, S.; Davies, C. Conflict and Kala-Azar: Determinants of Adverse Outcomes of Kala-Azar among Patients in Southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, 38 (5), 612–619.
  - (65) Burza, S.; Mahajan, R.; Sanz, M. G.; Sunyoto, T.; Kumar, R.; Mitra, G.; Lima, M. A. HIV and Visceral Leishmaniasis Coinfection in Bihar, India: An Underrecognized and Underdiagnosed Threat Against Elimination. *Clinical Infectious Diseases* **2014**, 59 (4), 552–555.
  - (66) Ramesh, V.; Singh, R.; Salotra, P. Short Communication: Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis - an Appraisal: Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health* **2007**, 12 (7), 848–851.
  - (67) Desjeux, P.; Ghosh, R.; Dhalaria, P.; Strub-Wourgaft, N.; Zijlstra, E. E. Report of the Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Consortium Meeting, New Delhi, India, 27–29 June 2012. *Parasites & Vectors* **2013**, 6 (1), 196.
  - (68) Brahmachari, U. A New Form of Cutaneous Leishmaniasis—Dermal Leishmanoid. *The Indian Medical Gazette* **1922**, 57 (4), 125–127.
  - (69) Sundar, S.; Singh, A. Recent Developments and Future Prospects in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease* **2016**, 3 (3–4), 98–109.
  - (70) Sundar, S.; More, D. K.; Singh, M. K.; Singh, V. P.; Sharma, S.; Makharia, A.; Kumar, P. C. K.; Murray, H. W. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. *Clinical Infectious Diseases* **2000**, 31 (4), 1104–1107.
  - (71) Loiseau, P.; Bories, C. Mechanisms of Drug Action and Drug Resistance in Leishmania as Basis for Therapeutic Target Identification and Design of Antileishmanial Modulators. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, 6 (5), 539–550.
  - (72) Zhou, Y.; Messier, N.; Ouellette, M.; Rosen, B. P.; Mukhopadhyay, R. *Leishmania* Major LmACR2 Is a Pentavalent Antimony Reductase That Confers Sensitivity to the Drug Pentostam. *Journal of Biological*



- Chemistry* **2004**, 279 (36), 37445–37451.
- (73) Denton, H.; McGREGOR, J. C.; Coombs, G. H. Reduction of Anti-Leishmanial Pentavalent Antimonial Drugs by a Parasite-Specific Thiol-Dependent Reductase, TDR1. *Biochemical Journal* **2004**, 381 (2), 405–412.
  - (74) dos Santos Ferreira, C.; Silveira Martins, P.; Demicheli, C.; Brochu, C.; Ouellette, M.; Frézard, F. Thiol-Induced Reduction of Antimony(V) into Antimony(III): A Comparative Study with Trypanothione, Cysteinyl-Glycine, Cysteine and Glutathione. *Biometals* **2003**, 16 (3), 441–446.
  - (75) Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.-C.; Barrett, M. P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A. W.; Mwenenchanya, R.; Papadopolou, B. Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2017**, 11 (12), e0006052.
  - (76) Sereno, D.; Holzmüller, P.; Mangot, I.; Cuny, G.; Ouassii, A.; Lemesre, J.-L. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania Infantum* Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, 45 (7), 2064–2069.
  - (77) Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H. Trypanothione Reductase from *Leishmania Donovanii*. Purification, Characterisation and Inhibition by Trivalent Antimonials. *European Journal of Biochemistry* **1995**, 230 (2), 460–468.
  - (78) Mandal, S.; Maharjan, M.; Singh, S.; Chatterjee, M.; Madhubala, R. Assessing Aquaglyceroporin Gene Status and Expression Profile in Antimony-Susceptible and -Resistant Clinical Isolates of *Leishmania Donovanii* from India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2010**, 65 (3), 496–507.
  - (79) Yorke, W. Recent Work on the Chemotherapy of Protozoal Infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1940**, 33 (5), 463–476.
  - (80) Diro, E.; Ritmeijer, K.; Boelaert, M.; Alves, F.; Mohammed, R.; Abongomera, C.; Ravinetto, R.; De Crop, M.; Fikre, H.; Adera, C.; et al. Use of Pentamidine As Secondary Prophylaxis to Prevent Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients, the First Twelve Months of a Prospective Cohort Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2015**, 9 (10), e0004087.
  - (81) Sands, M.; Kron, M.; Brown, R. Pentamidine: A Review. *Rev. Infect. Dis.* **1985**, 7 (5), 625–634.
  - (82) Basselin, M.; Lawrence, F.; Robert-Gero, M. Pentamidine Uptake in *Leishmania Donovanii* and *Leishmania Amazonensis* Promastigotes and Axenic Amastigotes. *Biochemical Journal* **1996**, 315 (2), 631–634.
  - (83) Kaur, G.; Rajput, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Research* **2014**, 2014, 1–11.
  - (84) Wiwanitkit, V. Interest in Paromomycin for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar). *Therapeutics and Clinical Risk Management* **2012**, 323.
  - (85) Davidson, R. N.; den Boer, M.; Ritmeijer, K. Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2009**, 103 (7), 653–660.
  - (86) Maarouf, M.; Lawrence, F.; Brown, S.; Robert-Gero, M. Biochemical Alterations in Paromomycin-Treated *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Parasitology Research* **1997**, 83 (2), 198–202.
  - (87) Maarouf, M.; Adeline, M. T.; Sogniac, M.; Vautrin, D.; Robert-Gero, M. Development and Characterization of Paromomycin-Resistant *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Parasite* **1998**, 5 (2), 167–173.
  - (88) Musa, A.; Khalil, E.; Hailu, A.; Olobo, J.; Balasegaram, M.; Omollo, R.; Edwards, T.; Rashid, J.; Mbui, J.; Musa, B.; et al. Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2012**, 6 (6), e1674.
  - (89) Alvar, J.; Croft, S.; Olliaro, P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. In *Advances in Parasitology*; Elsevier, 2006; Vol. 61, pp 223–274.
  - (90) Ramos, H.; Valdivieso, E.; Gamargo, M.; Dagger, F.; Cohen, B. E. Amphotericin B Kills Unicellular Leishmanias by Forming Aqueous Pores Permeable to Small Cations and Anions. *Journal of Membrane Biology* **1996**, 152 (1), 65–75.
  - (91) Mbongo, N.; Loiseau, P. M.; Billion, M. A.; Robert-Gero, M. Mechanism of Amphotericin B Resistance in *Leishmania Donovanii* Promastigotes. **1998**, 42, 6.
  - (92) Palacios, D. S.; Dailey, I.; Siebert, D. M.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. Synthesis-Enabled Functional Group Deletions Reveal Key Underpinnings of Amphotericin B Ion Channel and Antifungal Activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (17), 6733–6738.
  - (93) Szebeszyk, A.; Olshvang, E.; Shanzer, A.; Carver, P. L.; Gumienna-Kontecka, E. Harnessing the Power of Fungal Siderophores for the Imaging and Treatment of Human Diseases. *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, 327–328, 84–109.
  - (94) Rijal, S.; Ostyn, B.; Uranw, S.; Rai, K.; Bhattarai, N. R.; Dorlo, T. P. C.; Beijnen, J. H.; Vanaerschot, M.; Decuyper, S.; Dhakal, S. S.; et al. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-Azar

- in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clinical Infectious Diseases* **2013**, 56 (11), 1530–1538.
- (95) Barratt, G.; Saint-Pierre-Chazalet, M.; Loiseau, P. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. *Current Drug Metabolism* **2009**, 10 (3), 247–255.
- (96) Luque-Ortega, J. R.; Rivas, L. Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) Inhibits Cytochrome c Oxidase in Leishmania Donovanii Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, 51 (4), 1327–1332.
- (97) Paris, C.; Loiseau, P. M.; Bories, C.; Breard, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in Leishmania Donovanii Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48 (3), 852–859.
- (98) Seifert, K.; Pérez-Victoria, F. J.; Stettler, M.; Sánchez-Cañete, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Croft, S. L. Inactivation of the Miltefosine Transporter, LdMT, Causes Miltefosine Resistance That Is Conferred to the Amastigote Stage of Leishmania Donovanii and Persists in Vivo. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2007**, 30 (3), 229–235.
- (99) Castanys-Munoz, E.; Perez-Victoria, J. M.; Gamarro, F.; Castanys, S. Characterization of an ABCG-Like Transporter from the Protozoan Parasite Leishmania with a Role in Drug Resistance and Transbilayer Lipid Movement. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, 52 (10), 3573–3579.
- (100) [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)).
- (101) [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- (102) Büscher, P.; Cecchi, G.; Jamonneau, V.; Priotto, G. Human African Trypanosomiasis. *The Lancet* **2017**, 390 (10110), 2397–2409.
- (103) [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs529/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs529/en).
- (104) Steverding, D. The History of African Trypanosomiasis. *Parasites & Vectors* **2008**, 1 (1), 3.
- (105) Willinsky, J. *The Access Principle: The Case for Open Access to Research and Scholarship*; Digital libraries and electronic publishing; MIT Press: Cambridge, Mass, 2006.
- (106) Barrett, M. The Fall and Rise of Sleeping Sickness. *Lancet* **1999**, 353, 1113–1114.
- (107) Mumba, D.; Bohorquez, E.; Messina, J.; Kande, V.; Taylor, S. M.; Tshefu, A. K.; Muwonga, J.; Kashamuka, M. M.; Emch, M.; Tidwell, R.; et al. Prevalence of Human African Trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2011**, 5 (8), e1246.
- (108) Wamwiri, F. N.; Changasi, R. E. Tsetse Flies ( *Glossina* ) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review. *BioMed Research International* **2016**, 2016, 1–8.
- (109) Simarro, P.; Franco, J.; Diarra, A.; Jannin, J. Epidemiology of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology* **2014**, 257.
- (110) Molyneux, D. H. Host–Trypanosome Interactions in Glossina. *International Journal of Tropical Insect Science* **1980**, 1 (01), 39–46.
- (111) Capewell, P.; Veitch, N. J.; Turner, C. M. R.; Raper, J.; Berriman, M.; Hajduk, S. L.; MacLeod, A. Differences between Trypanosoma Brucei Gambiense Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2011**, 5 (9), e1287.
- (112) Giordani, F.; Morrison, L. J.; Rowan, T. G.; De Koning, H. P.; Barrett, M. P. The Animal Trypanosomiasis and Their Chemotherapy: A Review. *Parasitology* **2016**, 143 (14), 1862–1889.
- (113) Dyer, N. A.; Rose, C.; Ejeh, N. O.; Acosta-Serrano, A. Flying Tryps: Survival and Maturation of Trypanosomes in Tsetse Flies. *Trends in Parasitology* **2013**, 29 (4), 188–196.
- (114) Vickerman, K.; Tetley, L.; Hendry, K. A. K.; Turner, C. M. R. Biology of African Trypanosomes in the Tsetse Fly. *Biology of the Cell* **1988**, 64 (2), 109–119.
- (115) Kristensson, K.; Masocha, W.; Bentivoglio, M. Mechanisms of CNS Invasion and Damage by Parasites. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2013; Vol. 114, pp 11–22.
- (116) Kennedy, P. G. Clinical Features, Diagnosis, and Treatment of Human African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness). *The Lancet Neurology* **2013**, 12 (2), 186–194.
- (117) Lejon, V.; Bentivoglio, M.; Franco, J. R. Human African Trypanosomiasis. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2013; Vol. 114, pp 169–181.
- (118) Blum, J.; Schmid, C.; Burri, C. Clinical Aspects of 2541 Patients with Second Stage Human African Trypanosomiasis. *Acta Tropica* **2006**, 97 (1), 55–64.
- (119) Steverding, D. The History of Chagas Disease. *Parasites & Vectors* **2014**, 7 (1), 317.
- (120) Pérez-Molina, J. A.; Molina, I. Chagas Disease. *The Lancet* **2018**, 391 (10115), 82–94.
- (121) Bern, C. Chagas’ Disease. *New England Journal of Medicine* **2015**, 373 (5), 456–466.
- (122) Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; et al. The Revised Trypanosoma Cruzi Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications. *Infection, Genetics and Evolution* **2012**, 12 (2), 240–253.
- (123) Zingales, B.; Andrade, S.; Briones, M.; Campbell, D.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A.; Machado, C.; et al. A New Consensus for Trypanosoma Cruzi Intraspecific

- Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, 104 (7), 1051–1054.
- (124) Bern, C.; Martin, D. L.; Gilman, R. H. Acute and Congenital Chagas Disease. In *Advances in Parasitology*; Elsevier, 2011; Vol. 75, pp 19–47.
- (125) Rassi, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* **2012**, 26 (2), 275–291.
- (126) Salvador, F.; Treviño, B.; Sulleiro, E.; Pou, D.; Sánchez-Montalvá, A.; Cabezas, J.; Soriano, A.; Serre, N.; Gómez i Prat, J.; Pahissa, A.; et al. Trypanosoma Cruzi Infection in a Non-Endemic Country: Epidemiological and Clinical Profile. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, 20 (7), 706–712.
- (127) de Oliveira, R. B.; Meneghelli, U. G. Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease. **1998**, 93 (6), 6.
- (128) Horn, D. Antigenic Variation in African Trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2014**, 195 (2), 123–129.
- (129) Baker, N.; de Koning, H. P.; Mäser, P.; Horn, D. Drug Resistance in African Trypanosomiasis: The Melarsoprol and Pentamidine Story. *Trends in Parasitology* **2013**, 29 (3), 110–118.
- (130) Barrett, M. P.; Vincent, I. M.; Burchmore, R. J.; Kazibwe, A. J.; Matovu, E. Drug Resistance in Human African Trypanosomiasis. *Future Microbiology* **2011**, 6 (9), 1037–1047.
- (131) Babokhov, P.; Sanyaolu, A. O.; Oyibo, W. A.; Fagbenro-Beyioku, A. F.; Iriemenam, N. C. A Current Analysis of Chemotherapy Strategies for the Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Pathogens and Global Health* **2013**, 107 (5), 242–252.
- (132) Shapiro, T. A.; Englund, P. T. Selective Cleavage of Kinetoplast DNA Minicircles Promoted by Antitrypanosomal Drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, 87 (3), 950–954.
- (133) Damper, D.; Patton, C. L. Pentamidine Transport and Sensitivity in *Brucei* -Group Trypanosomes\*. *The Journal of Protozoology* **1976**, 23 (2), 349–356.
- (134) Berger, B. J. Uptake of Diamidine Drugs by the P2 Nucleoside Transporter in Melarsen-Sensitive and -Resistant Trypanosoma Brucei Brucei. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270 (47), 28153–28157.
- (135) de Koning, H. P. Transporters in African Trypanosomes: Role in Drug Action and Resistance. *International Journal for Parasitology* **2001**, 31 (5–6), 512–522.
- (136) Voogd, T.; Vansterkenburg, E.; Wilting, J.; Janssen, L. Recent Research on the Biological Activity of Suramin. *Pharmacol. Rev.* **1993**, 45, 177–203.
- (137) Hawking, F. Concentration of Bayer 205 (Germanin) in Human Blood and Cerebrospinal Fluid after Treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1940**, 34 (1), 37–52.
- (138) Nok, A. J. Arsenicals (Melarsoprol), Pentamidine and Suramin in the Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Parasitol. Rev.* **2003**, 90, 71–79.
- (139) Pépin, J.; Milord, F. The Treatment of Human African Trypanosomiasis. In *Advances in Parasitology*; Elsevier, 1994; Vol. 33, pp 1–47.
- (140) Balasegaram, M.; Young, H.; Chappuis, F.; Priotto, G.; Raguenaud, M.-E.; Checchi, F. Effectiveness of Melarsoprol and Eflornithine as First-Line Regimens for Gambiense Sleeping Sickness in Nine Médecins Sans Frontières Programmes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2009**, 103 (3), 280–290.
- (141) Schmid, C.; Richer, M.; Bilenge, C. M. M.; Josenando, T.; Chappuis, F.; Manthelot, C. R.; Nangouma, A.; Doua, F.; Asumu, P. N.; Simarro, P. P.; et al. Effectiveness of a 10-Day Melarsoprol Schedule for the Treatment of Late-Stage Human African Trypanosomiasis: Confirmation from a Multinational Study (I MPAMEL II). *The Journal of Infectious Diseases* **2005**, 191 (11), 1922–1931.
- (142) Keiser, J. Investigations of the Metabolites of the Trypanocidal Drug Melarsoprol. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2000**, 67 (5), 478–488.
- (143) Cunningham, M. L.; Zvelebil, M. J. J. M.; Fairlamb, A. H. Mechanism of Inhibition of Trypanothione Reductase and Glutathione Reductase by Trivalent Organic Arsenicals. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 221 (1), 285–295.
- (144) Fairlamb, A. H.; Horn, D. Melarsoprol Resistance in African Trypanosomiasis. *Trends in Parasitology* **2018**, 34 (6), 481–492.
- (145) Carter, N. S.; Fairlamb, A. H. Arsenical-Resistant Trypanosomes Lack an Unusual Adenosine Transporter. *Nature* **1993**, 361, 173–176.
- (146) Perry, M. R.; Wyllie, S.; Raab, A.; Feldmann, J.; Fairlamb, A. H. Chronic Exposure to Arsenic in Drinking Water Can Lead to Resistance to Antimonial Drugs in a Mouse Model of Visceral Leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110 (49), 19932–19937.
- (147) Steverding, D. The Development of Drugs for Treatment of Sleeping Sickness: A Historical Review. *Parasites & Vectors* **2010**, 3 (1), 15.
- (148) Priotto, G.; Pinoges, L.; Fursa, I. B.; Burke, B.; Nicolay, N.; Grillet, G.; Hewison, C.; Balasegaram, M. Safety and Effectiveness of First Line Eflornithine for *Trypanosoma Brucei* Gambiense Sleeping

- Sickness in Sudan: Cohort Study. *BMJ* **2008**, 336 (7646), 705–708.
- (149) Simarro, P. P.; Franco, J.; Diarra, A.; Postigo, J. A. R.; Jannin, J. Update on Field Use of the Available Drugs for the Chemotherapy of Human African Trypanosomiasis. *Parasitology* **2012**, 139 (07), 842–846.
- (150) Bacchi, C. J.; Garofalo, J.; Mockenhaupt, D.; McKann, P. P.; Diekema, K. A.; Pegg, A. E.; Nathan, H. C.; Mullaney, E. A.; Chunosoff, L.; Sjoerdsma, A.; et al. IN VIVO EFFECTS OF A-DL-DIFLUOROMETHYLORNITHINE ON THE METABOLISM AND MORPHOLOGY OF TRYPANOSOMA BRUCEI. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1983**, 7, 209–225.
- (151) Yarlett, N.; Bacchi, C. J. Effect of DL-O~Difluoromethylornithine on Polyamine Synthesis and Interconversion in *Trichomonas vaginalis* Grown in a Semi-Defined Medium. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1988**, 31 (1), 1–9.
- (152) Vincent, I. M.; Creek, D.; Watson, D. G.; Kamleh, M. A.; Woods, D. J.; Wong, P. E.; Burchmore, R. J. S.; Barrett, M. P. A Molecular Mechanism for Eflornithine Resistance in African Trypanosomes. *PLoS Pathogens* **2010**, 6 (11), e1001204.
- (153) Janssens, P. G.; De Muynck, A. Clinical Trials with “nifurtimox” in African Trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1977**, 57 (4–5), 475–480.
- (154) Kaiser, M.; Bray, M. A.; Cal, M.; Bourdin Trunz, B.; Torreale, E.; Brun, R. Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole, a New Oral Nitroimidazole Drug Candidate for Treatment of Sleeping Sickness. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55 (12), 5602–5608.
- (155) Pépin, J.; Milord, F.; Meurice, F.; Ethier, L.; Loko, L.; Mpia, B. High-Dose Nifurtimox for Arseno-Resistant *Trypanosoma Brucei* Gambiense Sleeping Sickness: An Open Trial in Central Zaire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1992**, 86 (3), 254–256.
- (156) Eperon, G.; Balasegaram, M.; Potet, J.; Mowbray, C.; Valverde, O.; Chappuis, F. Treatment Options for Second-Stage Gambiense Human African Trypanosomiasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2014**, 12 (11), 1407–1417.
- (157) Buschini, A.; Ferrarini, L.; Franzoni, S.; Galati, S.; Lazzaretti, M.; Mussi, F.; Northfleet de Albuquerque, C.; Maria Araújo Domingues Zucchi, T.; Poli, P. Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *Journal of Parasitology Research* **2009**, 2009, 1–11.
- (158) Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R. Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286 (15), 13088–13095.
- (159) Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro Drugs for the Treatment of Trypanosomatid Diseases: Past, Present, and Future Prospects. *Trends in Parasitology* **2014**, 30 (6), 289–298.
- (160) Priotto, G.; Fogg, C.; Balasegaram, M.; Erphas, O.; Louga, A.; Checchi, F.; Ghabri, S.; Piola, P. Three Drug Combinations for Late-Stage *Trypanosoma Brucei* Gambiense Sleeping Sickness: A Randomized Clinical Trial in Uganda. *PLoS Clinical Trials* **2006**, 1 (8), e39.
- (161) Schmid, C.; Kuemmerle, A.; Blum, J.; Ghabri, S.; Kande, V.; Mutombo, W.; Ilunga, M.; Lumpungu, I.; Mutanda, S.; Nganzobo, P.; et al. In-Hospital Safety in Field Conditions of Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy (NECT) for T. b. Gambiense Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2012**, 6 (11), e1920.
- (162) Coura, J. R.; Castro, S. L. de. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, 97 (1), 3–24.
- (163) Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Horn, D.; Kelly, J. M.; Cheeseman, I. A Mechanism for Cross-Resistance to Nifurtimox and Benznidazole in Trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (13), 5022–5027.
- (164) Murta, S. M. ; Gazzinelli, R. T.; Brener, Z.; Romanha, A. J. Molecular Characterization of Susceptible and Naturally Resistant Strains of *Trypanosoma Cruzi* to Benznidazole and Nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology* **1998**, 93 (2), 203–214.
- (165) Grunberg, E.; Beskid, G.; Cleeland, R.; De Lorenzo, W. F.; Titsworth, E.; Scholer, H. G.; Richle, R.; Brener, Z. Antiprotozoan and Antibacterial Activity of 2-Nitroimidazole Derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, 7, 513–519.
- (166) Alpern, J. D.; Lopez-Velez, R.; Stauffer, W. M. Access to Benznidazole for Chagas Disease in the United States—Cautious Optimism? *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2017**, 11 (9), e0005794.
- (167) Cançado, J. R. Criteria of Chagas Disease Cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1999**, 94 (suppl 1), 331–335.
- (168) Thornalley, P. J. PROTEIN AND NUCLEOTIDE DAMAGE BY GLYOXAL AND METHYLGLYOXAL IN PHYSIOLOGICAL SYSTEMS - ROLE IN AGEING AND DISEASE. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **2008**, 23 (1–2).
- (169) Campos, M. C. O.; Leon, L. L.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M. Benznidazole-Resistance in *Trypanosoma Cruzi*: Evidence That Distinct Mechanisms Can Act in Concert. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2014**, 193 (1), 17–19.



- (170) <https://www.nddi.org/diseases-projects/portfolio/>.
- (171) Philipp, M.; Bender, M. L. Inhibition of Serine Proteases by Arylboronic Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1971**, 68 (2), 478–480.
- (172) Jacobs, R. T.; Plattner, J. J.; Nare, B.; Wring, S. A.; Chen, D.; Freund, Y.; Gaukel, E. G.; Orr, M. D.; Perales, J. B.; Jenks, M.; et al. Benzoxaboroles: A New Class of Potential Drugs for Human African Trypanosomiasis. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, 3 (10), 1259–1278.
- (173) Mahalingam, A.; Geonnotti, A. R.; Balzarini, J.; Kiser, P. F. Activity and Safety of Synthetic Lectins Based on Benzoboroxole-Functionalized Polymers for Inhibition of HIV Entry. *Molecular Pharmaceutics* **2011**, 8 (6), 2465–2475.
- (174) Markham, A. Tavorole: First Global Approval. *Drugs* **2014**, 74 (13), 1555–1558.
- (175) Goldstein, E. J. C.; Citron, D. M.; Tyrrell, K. L.; Merriam, C. V. Comparative *In Vitro* Activities of SMT19969, a New Antimicrobial Agent, against *Clostridium Difficile* and 350 Gram-Positive and Gram-Negative Aerobic and Anaerobic Intestinal Flora Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, 57 (10), 4872–4876.
- (176) Zhang, Y.-K.; Plattner, J. J.; Easom, E. E.; Zhou, Y.; Akama, T.; Bu, W.; White, W. H.; Defauw, J. M.; Winkle, J. R.; Balko, T. W.; et al. Discovery of an Orally Bioavailable Isoxazoline Benzoxaborole (AN8030) as a Long Acting Animal Ectoparasiticide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25 (23), 5589–5593.
- (177) Jacobs, R. T.; Nare, B.; Wring, S. A.; Orr, M. D.; Chen, D.; Sligar, J. M.; Jenks, M. X.; Noe, R. A.; Bowling, T. S.; Mercer, L. T.; et al. SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2011**, 5 (6), e1151.
- (178) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01533961>.
- (179) <https://www.nddi.org/diseases-projects/portfolio/scyx-7158/>.
- (180) Jones, D. C.; Foth, B. J.; Urbaniak, M. D.; Patterson, S.; Ong, H. B.; Berriman, M.; Fairlamb, A. H. Genomic and Proteomic Studies on the Mode of Action of Oxaboroles against the African Trypanosome. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2015**, 9 (12), e0004299.
- (181) Jacob, R. M.; Régnier, G. L.; Crisan, C. Nitroimidazolealkanols and Acyl Derivatives. US Patent 2944061.
- (182) Winkelmann, E.; Raether, W.; Sinharay, A. Chemotherapeutically Active Nitro Compounds. 4.5-Nitroimidazoles (Part II). *Arzneimittelforschung* **1978**, 28 (3), 739–749.
- (183) Jennings, F. W.; Urquhart, G. M. The Use of the 2 Substituted 5-Nitroimidazole, Fexinidazole (Hoe 239) in the Treatment of Chronic T. Brucei Infections in Mice. *Z Parasitenkd* **1983**, 69 (5), 577–581.
- (184) Torreele, E.; Bourdin Trunz, B.; Tweats, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Mazué, G.; Bray, M. A.; Pécou, B. Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2010**, 4 (12), e923.
- (185) Kaiser, M.; Bray, M. A.; Cal, M.; Bourdin Trunz, B.; Torreele, E.; Brun, R. Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole, a New Oral Nitroimidazole Drug Candidate for Treatment of Sleeping Sickness. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55 (12), 5602–5608.
- (186) Tarral, A.; Blesson, S.; Mordt, O. V.; Torreele, E.; Sassella, D.; Bray, M. A.; Hovsepian, L.; Evène, E.; Gualano, V.; Felices, M.; et al. Determination of an Optimal Dosing Regimen for Fexinidazole, a Novel Oral Drug for the Treatment of Human African Trypanosomiasis: First-in-Human Studies. *Clinical Pharmacokinetics* **2014**, 53 (6), 565–580.
- (187) Mesu, V. K. B. K.; Kalonji, W. M.; Bardonneau, C.; Mordt, O. V.; Blesson, S.; Simon, F.; Delhomme, S.; Bernhard, S.; Kuziena, W.; Lubaki, J.-P. F.; et al. Oral Fexinidazole for Late-Stage African Trypanosoma Brucei Gambiense Trypanosomiasis: A Pivotal Multicentre, Randomised, Non-Inferiority Trial. *The Lancet* **2018**, 391 (10116), 144–154.
- (188) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03025789?term=fexinidazole&rank=3>.
- (189) Sokolova, A. Y.; Wyllie, S.; Patterson, S.; Oza, S. L.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. Cross-Resistance to Nitro Drugs and Implications for Treatment of Human African Trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, 54 (7), 2893–2900.
- (190) Yeates, C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* **2002**, 3 (10), 1446–1452.
- (191) Beveridge, E.; Goodwin, L. G.; Walls, L. P. A New Series of Leishmanicides. *Nature* **1958**, 182 (4631), 316–317.
- (192) Kinnamon, K. E.; Steck, E. A.; Loizeaux, P. S.; Hanson, W. L.; Chapman Jr, W. L.; Waits, V. B. The Antileishmanial Activity of Lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1978**, 27 (4), 751–757.
- (193) Sherwood, J. A.; Gachihi, G. S.; Muigai, R. K.; Skillman, D. R.; Mugo, M.; Rashid, J. R.; Wasunna, K. M. A.; Were, J. B. O.; Kasili, S. K.; Mbugua, J. M.; et al. Phase 2 Efficacy Trial of an Oral 8-Aminoquinoline (WR6026) for Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* **1994**, 19 (6), 1034–1039.

- (194) Valli, L. C.; Grogl, M.; Schuster, B.; Brewer, T.; Sanchez, J.; Berman, J.; Carvalho, S. F.; Dietze, R.; Milhous, W. Phase 2 Trial of WR6026, an Orally Administered 8-Aminoquinoline, in the Treatment of Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania Chagasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2001**, 65 (6), 685–689.
- (195) Wasunna, M. K.; Rashid, J. R.; Mbui, J.; Kirigi, G.; Kinoti, D.; Lodenyo, H.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J. A PHASE II DOSE-INCREASING STUDY OF SITAMAQUINE FOR THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN KENYA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 6.
- (196) Sinha, P. K.; Mohamed, K.; Al-Banna, M.; Sundar, S.; Miller, A. K.; Buckley, R.; Dixon, S. A. Pharmacokinetics of Oral Sitamaquine Taken with or without Food and Safety and Efficacy for Treatment of Visceral Leishmaniasis: A Randomized Study in Bihar, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2011**, 84 (6), 892–900.
- (197) Loiseau, P. M.; Cojean, S.; Schrével, J. Sitamaquine as a Putative Antileishmanial Drug Candidate: From the Mechanism of Action to the Risk of Drug Resistance. *Parasite* **2011**, 18 (2), 115–119.
- (198) Dueñas-Romero, A. M.; Loiseau, P. M.; Saint-Pierre-Chazalet, M. Interaction of Sitamaquine with Membrane Lipids of *Leishmania Donovanii* Promastigotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, 1768 (2), 246–252.
- (199) Lopez-Martin, C.; Perez-Victoria, J. M.; Carvalho, L.; Castanys, S.; Gamarro, F. Sitamaquine Sensitivity in *Leishmania* Species Is Not Mediated by Drug Accumulation in Acidocalcisomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, 52 (11), 4030–4036.
- (200) Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R. C.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. *Science Translational Medicine* **2012**, 4 (119), 119re1-119re1.
- (201) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/fexinidazole-vl/>.
- (202) Bahia, M. T.; Nascimento, A. F. S.; Mazzeti, A. L.; Marques, L. F.; Gonçalves, K. R.; Mota, L. W. R.; Diniz, L. de F.; Caldas, I. S.; Talvani, A.; Shackleford, D. M.; et al. Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole Metabolites, Potential New Drug Candidates for Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, 58 (8), 4362–4370.
- (203) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>.
- (204) Fairlamb, A. H.; Patterson, S. Current and Future Prospects of Nitro-Compounds as Drugs for Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Current Medicinal Chemistry* **2018**, 25.
- (205) Urbina, J. A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2015**, 62 (1), 149–156.
- (206) Diniz, L. de F.; Mazzeti, A. L.; Caldas, I. S.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T. Outcome of E1224-Benznidazole Combination Treatment for Infection with a Multidrug-Resistant *Trypanosoma Cruzi* Strain in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, 62 (6), e00401-18.
- (207) Mowbray, C. Anti-Leishmanial Drug Discovery: Past, Present and Future Perspectives. In *Drug Discovery for Leishmaniasis*; 2017; pp 24–36.
- (208) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/oxaborole-dndi-6148/>.
- (209) Van den Kerkhof, M.; Mabile, D.; Chatelain, E.; Mowbray, C. E.; Braillard, S.; Hendrickx, S.; Maes, L.; Caljon, G. In Vitro and in Vivo Pharmacodynamics of Three Novel Antileishmanial Lead Series. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2018**, 8 (1), 81–86.
- (210) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/nitroimidazole/>.
- (211) Thompson, A. M.; O'Connor, P. D.; Blaser, A.; Yardley, V.; Maes, L.; Gupta, S.; Launay, D.; Martin, D.; Franzblau, S. G.; Wan, B.; et al. Repositioning Antitubercular 6-Nitro-2,3-Dihydroimidazo[2,1-*b*][1,3]Oxazoles for Neglected Tropical Diseases: Structure–Activity Studies on a Preclinical Candidate for Visceral Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59 (6), 2530–2550.
- (212) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/vl-2098/>.
- (213) Thompson, A. M.; O'Connor, P. D.; Marshall, A. J.; Blaser, A.; Yardley, V.; Maes, L.; Gupta, S.; Launay, D.; Braillard, S.; Chatelain, E.; et al. Development of (6*R*)-2-Nitro-6-[4-(Trifluoromethoxy)Phenoxy]-6,7-Dihydro-5*H*-Imidazo[2,1-*b*][1,3]Oxazine (DNDI-8219): A New Lead for Visceral Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61 (6), 2329–2352.
- (214) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/dndi-5561/>.
- (215) Mowbray, C. Anti-Leishmanial Drug Discovery: Past, Present and Future Perspectives. In *Drug Discovery for Leishmaniasis*; 2017; pp 24–36.
- (216) Mowbray, C. E.; Braillard, S.; Speed, W.; Glossop, P. A.; Whitlock, G. A.; Gibson, K. R.; Mills, J. E. J.; Brown, A. D.; Gardner, J. M. F.; Cao, Y.; et al. Novel Amino-Pyrazole Ureas with Potent In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (24), 9615–9624.
- (217) Berninger, M.; Schmidt, I.; Ponte-Sucre, A.; Holzgrabe, U. Novel Lead Compounds in Pre-Clinical Development against African Sleeping Sickness. *MedChemComm* **2017**, 8 (10), 1872–1890.
- (218) Wenzler, T.; Boykin, D. W.; Ismail, M. A.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; Brun, R. New Treatment Option

- for Second-Stage African Sleeping Sickness: In Vitro and In Vivo Efficacy of Aza Analogs of DB289. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53 (10), 4185–4192.
- (219) Ansede, J. H.; Voyksner, R. D.; Ismail, M. A.; Boykin, D. W.; Tidwell, R. R.; Hall, J. E. *In Vitro* Metabolism of an Orally Active *O*-Methyl Amidoxime Prodrug for the Treatment of CNS Trypanosomiasis. *Xenobiotica* **2005**, 35 (3), 211–226.
- (220) Thuita, J. K.; Wolf, K. K.; Murilla, G. A.; Bridges, A. S.; Boykin, D. W.; Mutuku, J. N.; Liu, Q.; Jones, S. K.; Gem, C. O.; Ching, S.; et al. Chemotherapy of Second Stage Human African Trypanosomiasis: Comparison between the Parenteral Diamidine DB829 and Its Oral Prodrug DB868 in Vervet Monkeys. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2015**, 9 (2), e0003409.
- (221) Tatipaka, H. B.; Gillespie, J. R.; Chatterjee, A. K.; Norcross, N. R.; Hulverson, M. A.; Ranade, R. M.; Nagendar, P.; Creason, S. A.; McQueen, J.; Duster, N. A.; et al. Substituted 2-Phenylimidazopyridines: A New Class of Drug Leads for Human African Trypanosomiasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57 (3), 828–835.
- (222) Khare, S.; Nagle, A. S.; Biggart, A.; Lai, Y. H.; Liang, F.; Davis, L. C.; Barnes, S. W.; Mathison, C. J. N.; Myburgh, E.; Gao, M.-Y.; et al. Proteasome Inhibition for Treatment of Leishmaniasis, Chagas Disease and Sleeping Sickness. *Nature* **2016**, 537 (7619), 229–233.
- (223) Patrick, D. A.; Gillespie, J. R.; McQueen, J.; Hulverson, M. A.; Ranade, R. M.; Creason, S. A.; Herbst, Z. M.; Gelb, M. H.; Buckner, F. S.; Tidwell, R. R. Urea Derivatives of 2-Aryl-Benzothiazol-5-Amines: A New Class of Potential Drugs for Human African Trypanosomiasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60 (3), 957–971.
- (224) Russell, S.; Rahmani, R.; Jones, A. J.; Newson, H. L.; Neilde, K.; Cotillo, I.; Rahmani Khajouei, M.; Ferrins, L.; Qureishi, S.; Nguyen, N.; et al. Hit-to-Lead Optimization of a Novel Class of Potent, Broad-Spectrum Trypanosomacides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59 (21), 9686–9720.
- (225) <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/>.
- (226) Bahia, M. T.; Diniz, L. de F.; Mosqueira, V. C. F. Therapeutical Approaches under Investigation for Treatment of Chagas Disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2014**, 23 (9), 1225–1237.
- (227) Maertens, J. A. History of the Development of Azole Derivatives. *Clinical Microbiology and Infection* **2004**, 10, 1–10.
- (228) Morillo, C. A.; Waskin, H.; Sosa-Estani, S.; del Carmen Bangher, M.; Cuneo, C.; Milesi, R.; Mallagray, M.; Apt, W.; Beloscar, J.; Gascon, J.; et al. Benzimidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers. *Journal of the American College of Cardiology* **2017**, 69 (8), 939–947.
- (229) Cronin, S.; Chandrasekar, P. H. Safety of Triazole Antifungal Drugs in Patients with Cancer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2010**, 65 (3), 410–416.
- (230) Villalta, F.; Dobish, M. C.; Nde, P. N.; Kleshchenko, Y. Y.; Hargrove, T. Y.; Johnson, C. A.; Waterman, M. R.; Johnston, J. N.; Lepesheva, G. I. VNI Cures Acute and Chronic Experimental Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases* **2013**, 208 (3), 504–511.
- (231) Keenan, M.; Chaplin, J. H.; Alexander, P. W.; Abbott, M. J.; Best, W. M.; Khong, A.; Botero, A.; Perez, C.; Cornwall, S.; Thompson, R. A.; et al. Two Analogues of Fenarimol Show Curative Activity in an Experimental Model of Chagas Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (24), 10158–10170.
- (232) Truong, D. Tolcapone: Review of Its Pharmacology and Use as Adjunctive Therapy in Patients with Parkinson's Disease. *Clinical Interventions in Aging* **2009**, 109.
- (233) Sorkin, E. M.; Clissold, S. P.; Brogden, R. N. Nifedipine. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy, in Ischaemic Heart Disease, Hypertension and Related Cardiovascular Disorders. *Drugs* **1985**, 30 (3), 182–274.
- (234) Nakamura, S. Structure of Azomycin, a New Antibiotic. *Pharm. Bull.* **1955**, 3 (5), 379–383.
- (235) Anderson, R.; Groundwater, P. W.; Todd, A.; Worsley, A. *Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications*; 2012.
- (236) Ang, C. W.; Jarrad, A. M.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60 (18), 7636–7657.
- (237) Löfmark, S.; Edlund, C.; Nord, C. E. Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases* **2010**, 50 (s1), S16–S23.
- (238) Samuelson, J. Why Metronidazole Is Active against Both Bacteria and Parasites. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* **1999**, 43, 9.
- (239) Skold, M.; Gnarp, H.; Hillstrom, L. Ornidazole: A New Antiprotozoal Compound for Treatment of Trichomonas Vaginalis Infection. *Sexually Transmitted Infections* **1977**, 53 (1), 44–48.
- (240) Videau, D.; Niel, G.; Siboulet, A.; Catalan, F. Secnidazole. A 5-Nitroimidazole Derivative with a Long Half-Life. *Sexually Transmitted Infections* **1978**, 54 (2), 77–80.
- (241) Nesslany, F.; Brugier, S.; Mouriès, M.-A.; Le Curieux, F.; Marzin, D. In Vitro and in Vivo Chromosomal Aberrations Induced by Megazol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*



- Mutagenesis* **2004**, 560 (2), 147–158.
- (242) Lancini, G. C.; Lazzari, L. The Synthesis of Azomycin (2-Nitroimidazole). *Experientia* **1965**, 21 (2), 83.
- (243) Cavalleri, B.; Ballotta, R.; Arioli, V.; Lancini, G. New 5-Substituted 1-Alkyl-2-Nitroimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, 16 (5), 557–560.
- (244) Sharma, R. Nitroimidazole Radiopharmaceuticals in Hypoxia: Part II Cytotoxicity and Radiosensitization Applications. *Current Radiopharmaceuticals* **2011**, 4 (4), 379–393.
- (245) Williamson, J. Chemotherapy and Chemoprophylaxis of African Trypanosomiasis. *Exp. Parasitol.* **1962**, 12 (4), 323–367.
- (246) Patterson, S.; Wyllie, S. Nitro Drugs for the Treatment of Trypanosomatid Diseases: Past, Present, and Future Prospects. *Trends in Parasitology* **2014**, 30 (6), 289–298.
- (247) Huttner, A.; Verhaegh, E. M.; Harbarth, S.; Muller, A. E.; Theuretzbacher, U.; Mouton, J. W. Nitrofurantoin Revisited: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2015**, 70 (9), 2456–2464.
- (248) Carron, M. C. E. Antibacterial Nitrofurfurylidene Derivatives and Methods of Using Same. US3290213A.
- (249) Begovic, B.; Ahmetagic, S.; Calkic, L.; Vehabovic, M.; Kovacevic, S.; Catic, T.; Mehic, M. Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. *Materia Socio Medica* **2016**, 28 (6), 454.
- (250) Rossignol, J.-F.; Cavier, X. New Derivative of 2-Benzamido-5-Nitrothiols. *Chem. Abstr.* **1975**, 83, 28216.
- (251) Rossignol, J.-F.; Maisonneuve, H.; Cho, Y. W. Nitroimidazoles in the Treatment of Trichomoniasis, Giardiasis, and Amebiasis. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **1984**, 22 (2), 63–72.
- (252) McVay, C. S.; Rolfe, R. D. In Vitro and In Vivo Activities of Nitazoxanide against *Clostridium Difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, 44 (9), 2254–2258.
- (253) Saz, A. K.; Martinez, L. M. ENZYMATIC BASIS OF RESISTANCE TO AUREOMYCIN. *J. Biol. Chem.* **1956**, 223 (1), 282–295.
- (254) Cartwright, N. J.; Cain, R. B. Bacterial Degradation of the Nitrobenzoic Acids. *Biochemical Journal* **1959**, 71 (2), 248–261.
- (255) Roldán, M. D.; Pérez-Reinado, E.; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C. Reduction of Polynitroaromatic Compounds: The Bacterial Nitroreductases. *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, 32 (3), 474–500.
- (256) Ahmed, Z. U.; Vining, L. C. Evidence for a Chromosomal Location of the Genes Coding for Chloramphenicol Production in *Streptomyces Venezuelae*. *J. BACTERIOL.* **1983**, 154, 6.
- (257) Ohmori, T.; Hagiwara, S.; Ueda, A.; Minosha, Y.; Yamada, K. Production of Pyoluteorin and Its Derivatives from N-Paraffin by *Pseudomonas Aeruginosa* S10B2. *Agricol Biol Chem* **1978**, 42 (11), 2031–2036.
- (258) Hashimoto, M.; Hattori, K. Isopyrrolnitrin: A Metabolite from *Pseudomonas*. *Bull Chem Soc Jpn* **1966**, 39 (2), 410.
- (259) Tischler, M.; Ayer, S. W.; Andersen, R. J. Nitrophenols from Northeast Pacific Bryozoans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1986**, 84 (1), 43–45.
- (260) Timmis, K. N.; Pieper, D. H. Bacteria Designed for Bioremediation. *Trends in Biotechnology* **1999**, 17 (5), 201–204.
- (261) Somerville, C. C.; Nishino, S. F.; Spain, J. C. Purification and Characterization of Nitrobenzene Nitroreductase from *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* JS45. *Journal of Bacteriology* **1995**, 177 (13), 3837–3842.
- (262) Xiao, Y.; Wu, J.-F.; Liu, H.; Wang, S.-J.; Liu, S.-J.; Zhou, N.-Y. Characterization of Genes Involved in the Initial Reactions of 4-Chloronitrobenzene Degradation in *Pseudomonas Putida* ZWL73. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 73 (1), 166–171.
- (263) Rau, J.; Stolz, A. Oxygen-Insensitive Nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia Coli* Function under Anaerobic Conditions as Lawsons-Dependent Azo Reductases. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, 69 (6), 3448–3455.
- (264) Liochev, S. I.; Hausladen, A.; Fridovich, I. Nitroreductase A Is Regulated as a Member of the SoxRS Regulon of *Escherichia Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96 (7), 3537–3539.
- (265) Kurumata, M.; Takahashi, M.; Sakamoto, A.; Ramos, J. L.; Nepovim, A.; Vanek, T.; Hirata, T.; Morikawa, H. Tolerance to, and Uptake and Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) Are Enhanced by the Expression of a Bacterial Nitroreductase Gene in *Arabidopsis Thaliana*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2005**, 60 (3–4), 272–278.
- (266) Knox, R. J.; Friedlos, F.; Boland, M. P. The Bioactivation of CB 1954 and Its Use as a Prodrug in Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT). *Cancer and Metastasis Reviews* **1993**, 12 (2), 195–212.
- (267) Sharma, S. K.; Bagshawe, K. D. Translating Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) and

- Prospects for Combination. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2017**, 17 (1), 1–13.
- (268) Lukashev, A. N.; Fuerer, C.; Chen, M.-J.; Searle, P.; Iggo, D. R. Late Expression of Nitroreductase in an Oncolytic Adenovirus Sensitizes Colon Cancer Cells to the Prodrug CB1954. *Human Gene Ther.* **2005**, 16, 1473–1483.
- (269) Lovering, A. L.; Hyde, E. I.; Searle, P. F.; White, S. A. The Structure of Escherichia Coli Nitroreductase Complexed with Nicotinic Acid: Three Crystal Forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **2001**, 309 (1), 203–213.
- (270) Tanner, J. J.; Lei, B.; Tu, S.-C.; Krause, K. L. Flavin Reductase P: Structure of a Dimeric Enzyme That Reduces Flavin <sup>†</sup>, <sup>‡</sup>. *Biochemistry* **1996**, 35 (42), 13531–13539.
- (271) Race, P. R.; Lovering, A. L.; White, S. A.; Grove, J. I.; Searle, P. F.; Wrighton, C. W.; Hyde, E. Kinetic and Structural Characterisation of Escherichia Coli Nitroreductase Mutants Showing Improved Efficacy for the Prodrug Substrate CB1954. *Journal of Molecular Biology* **2007**, 368 (2), 481–492.
- (272) Peterson, F. J.; Mason, R. P.; Hovsepian, J.; Holzman, J. L. Oxygen-Sensitive and -Insensitive Nitroreduction by Escherichia Coli and Rat Hepatic Microsomes. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (10), 4009–4014.
- (273) Hubbard, L.; McElroy, W. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the Nitroreductase Gene from Enterobacter CZoucue. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266 (7), 4126–4130.
- (274) Race, P. R.; Lovering, A. L.; Green, R. M.; Ossor, A.; White, S. A.; Searle, P. F.; Wrighton, C. J.; Hyde, E. I. Structural and Mechanistic Studies of Escherichia Coli Nitroreductase with the Antibiotic Nitrofurazone: REVERSED BINDING ORIENTATIONS IN DIFFERENT REDOX STATES OF THE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (14), 13256–13264.
- (275) Mason, P.; Holzman, L. THE ROLE OF CATALYTIC SUPEROXIDE FORMATION IN THE O<sub>2</sub> INHIBITION OF NITROREDUCTASE. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **1975**, 67 (4), 8.
- (276) Koder, R. L.; Haynes, C. A.; Rodgers, M. E.; Rodgers, D. W.; Miller, A.-F. Flavin Thermodynamics Explain the Oxygen Insensitivity of Enteric Nitroreductases <sup>†</sup>. *Biochemistry* **2002**, 41 (48), 14197–14205.
- (277) Haynes, C. A.; Koder, R. L.; Miller, A.-F.; Rodgers, D. W. Structures of Nitroreductase in Three States: EFFECTS OF INHIBITOR BINDING AND REDUCTION. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (13), 11513–11520.
- (278) Smith, W. W.; Burnett, R. M.; Darling, G. D.; Ludwig, M. L. Structure of the Semiquinone Form of Flavodoxin from Clostridium MP. *Journal of Molecular Biology* **1977**, 117 (1), 195–225.
- (279) Wyllie, S.; Patterson, S.; Fairlamb, A. H. Assessing the Essentiality of Leishmania Donovanii Nitroreductase and Its Role in Nitro Drug Activation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, 57 (2), 901–906.
- (280) Voak, A. A.; Gobalakrishnapillai, V.; Seifert, K.; Balczó, E.; Hu, L.; Hall, B. S.; Wilkinson, S. R. An Essential Type I Nitroreductase from Leishmania Major Can Be Used to Activate Leishmanicidal Prodrugs. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (40), 28466–28476.
- (281) Patterson, S.; Wyllie, S.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Auer, J. L.; Osuna-Cabello, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The Anti-Tubercular Drug Delamanid as a Potential Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. *eLife* **2016**, 5.
- (282) Patterson, S.; Wyllie, S.; Stojanovski, L.; Perry, M. R.; Simeons, F. R. C.; Norval, S.; Osuna-Cabello, M.; De Rycker, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. The R Enantiomer of the Antitubercular Drug PA-824 as a Potential Oral Treatment for Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, 57 (10), 4699–4706.
- (283) Wyllie, S.; Roberts, A. J.; Norval, S.; Patterson, S.; Foth, B. J.; Berriman, M.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H. Activation of Bicyclic Nitro-Drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in Leishmania. *PLOS Pathogens* **2016**, 12 (11), e1005971.
- (284) Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Horn, D.; Kelly, J. M.; Cheeseman, I. A Mechanism for Cross-Resistance to Nifurtimox and Benznidazole in Trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (13), 5022–5027.
- (285) Leitsch, D.; Kolarich, D.; Wilson, I. B. H.; Altmann, F.; Duchêne, M. Nitroimidazole Action in Entamoeba Histolytica: A Central Role for Thioredoxin Reductase. *PLoS Biology* **2007**, 5 (8), e211.
- (286) Whitmore, G. F.; Varghese, A. J. The Biological Properties of Reduced Nitroheterocyclics and Possible Underlying Biochemical Mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35 (1), 97–103.
- (287) Raleigh, J. A.; Koch, C. J. Importance of Thiols in the Reductive Binding of 2-Nitroimidazoles to Macromolecules. *Biochemical Pharmacology* **1990**, 40 (11), 2457–2464.
- (288) Kedderis, G. L.; Argenbright, L. S.; Miwa, G. T. Covalent Interaction of 5-Nitroimidazoles with DNA and Protein in Vitro: Mechanism of Reductive Activation. *Chemical Research in Toxicology* **1989**, 2 (3), 146–149.
- (289) Peterson, F. J.; Mason, R. P.; Hovsepian, J.; Holzman, J. L. Oxygen-Sensitive and -Insensitive

- Nitroreduction by Escherichia Coli and Rat Hepatic Microsomes. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (10), 4009–4014.
- (290) Deavall, D. G.; Martin, E. A.; Horner, J. M.; Roberts, R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* **2012**, 2012, 1–13.
- (291) Neeley, W. L.; Essigmann, J. M. Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, 19 (4), 491–505.
- (292) Avery, S. V. Molecular Targets of Oxidative Stress. *Biochemical Journal* **2011**, 434 (2), 201–210.
- (293) Bandyopadhyay, S.; Gronostajski, R. Identification of a Conserved Oxidation-Sensitive Cysteine Residue in the NFI Family of DNA-Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269 (47), 29949–29955.
- (294) Padda, R. S.; Wang, C.; Hughes, J. B.; Kutty, R.; Bennett, G. N. MUTAGENICITY OF NITROAROMATIC DEGRADATION COMPOUNDS. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2003**, 22 (10), 2293.
- (295) Traversi, D.; Degan, R.; De Marco, R.; Gilli, G.; Pignata, C.; Villani, S.; Bono, R. Mutagenic Properties of PM2.5 Urban Pollution in the Northern Italy: The Nitro-Compounds Contribution. *Environment International* **2009**, 35 (6), 905–910.
- (296) Kovacic, P.; Somanathan, R. Nitroaromatic Compounds: Environmental Toxicity, Carcinogenicity, Mutagenicity, Therapy and Mechanism: Nitro Aromatic Pollutants. *Journal of Applied Toxicology* **2014**, 34 (8), 810–824.
- (297) Buschini, A.; Ferrarini, L.; Franzoni, S.; Galati, S.; Lazzaletti, M.; Mussi, F.; Northfleet de Albuquerque, C.; Maria Araújo Domingues Zucchi, T.; Poli, P. Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. *Journal of Parasitology Research* **2009**, 2009, 1–11.
- (298) Ames, B. N.; Durston, W. E.; Yamasaki, E.; Lee, F. D. Carcinogens Are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, 70 (8), 2281–2285.
- (299) Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2000**, 455 (1–2), 29–60.
- (300) Ames, B. N.; Lee, F. D.; Durston, W. E. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, 70 (3), 782–786.
- (301) Ames, B. N.; McCann, J. METHODS FOR DETECTING CARCINOGENS AND MUTAGENS WITH THE SALMONELLA/MAMMALIAN-MICROSOME MUTAGENICITY TEST. *Mutat. Res.* **1975**, 31, 347–364.
- (302) Levin, D. E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. A New Salmonella Tester Strain, TA97, for the Detection of Frameshift Mutagens A Run of Cytosines as a Mutational Hot-Spot. *Mutat. Res.* **1982**, 94, 315–330.
- (303) de Oliveira, I. M.; Zanotto-Filho, A.; Moreira, J. C. F.; Bonatto, D.; Henriques, J. A. P. The Role of Two Putative Nitroreductases, Frn2p and Hbn1p, in the Oxidative Stress Response in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* **2009**, n/a-n/a.
- (304) Tejs, S. The Ames Test: A Methodological Short Review. *Environ. Biotechnol* **2008**, 4 (1), 7–14.
- (305) Levin, D. E.; Hollstein, M.; Christman, M. F.; Schwiers, E. A.; Ames, B. N. A New Salmonella Tester Strain (TA102) with AT Base Pairs at the Site of Mutation Detects Oxidative Mutagens. *Proc. Natl. Soc. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 7445–7449.
- (306) Tatsumi, K.; Doi, T.; Yoshimura, H.; Koga, H.; Horiuchi, T. Oxygen--Insensitive Nitrofurantoin Reductases in Salmonella Typhimurium TA100. *J. Pharmacobiodyn.* **1982**, 5, 423–429.
- (307) Yanto, Y.; Hall, M.; Bommarius, A. S. Nitroreductase from Salmonella Typhimurium: Characterization and Catalytic Activity. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, 8 (8), 1826.
- (308) Speck, W. T.; Blumer, J. L.; Rosenkranz, E. J.; Rosenkranz, H. S. Of Niridazole in Nitroreductase-. *Cancer Res.* **1981**, 41, 2305–2307.
- (309) Rosenkranz, E. J.; McCoy, E. C.; Mermelstein, R.; Rosenkranz, H. S. Evidence for the Existence of Distinct Nitroreductases in *Salmonella Typhimurium* : Roles in Mutagenesis. *Carcinogenesis* **1982**, 3 (1), 121–123.
- (310) Ostling, O.; Johanson, K. J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 123 (1), 291–298.
- (311) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* **1988**, 175 (1), 184–191.
- (312) Araldi, R. P.; Melo, T. C.; Diniz, N.; Mazzuchelli-de-Souza, J.; Carvalho, R. F.; Beçak, W.; Stocco, R. C. Bovine Papillomavirus Clastogenic Effect Analyzed in Comet Assay. *BioMed Research International* **2013**, 2013, 1–7.
- (313) Azqueta, A.; Collins, A. R. The Essential Comet Assay: A Comprehensive Guide to Measuring DNA Damage and Repair. *Archives of Toxicology* **2013**, 87 (6), 949–968.

- (314) Collins, A. R. Measuring Oxidative Damage to DNA and Its Repair with the Comet Assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, 1840 (2), 794–800.
- (315) Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2000**, 455 (1–2), 29–60.
- (316) Gutzkow, K. B.; Langleite, T. M.; Meier, S.; Graupner, A.; Collins, A. R.; Brunborg, G. High-Throughput Comet Assay Using 96 Minigels. *Mutagenesis* **2013**, 28 (3), 333–340.
- (317) Perdry, H.; Gutzkow, K. B.; Chevalier, M.; Huc, L.; Brunborg, G.; Boutet-Robinet, E. Validation of Gelbond® High-Throughput Alkaline and Fpg-Modified Comet Assay Using a Linear Mixed Model: Validation of High-Throughput Comet Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2018**, 59 (7), 595–602.
- (318) Krishna, G.; Hayashi, M. In Vivo Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct and Data Interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2000**, 455 (1–2), 155–166.
- (319) Bonassi, S.; Znaor, A.; Ceppi, M.; Lando, C.; Chang, W. P.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zeiger, E.; Ban, S.; Barale, R.; et al. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis* **2006**, 28 (3), 625–631.
- (320) Morita, T.; MacGregor, J. T.; Hayashi, M. Micronucleus Assays in Rodent Tissues Other than Bone Marrow. *Mutagenesis* **2011**, 26 (1), 223–230.
- (321) Kirsch-Volders, M.; Sofuni, T.; Aardema, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M.; Kirchner, S.; Lorge, E.; Morita, T.; et al. Report from the in Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2003**, 540 (2), 153–163.
- (322) Miller, B. Evaluation of the in Vitro Micronucleus Test as an Alternative to the in Vitro Chromosomal Aberration Assay: Position of the GUM Working Group on the in Vitro Micronucleus Test. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **1998**, 410 (1), 81–116.
- (323) Paloque, L.; Verhaeghe, P.; Casanova, M.; Castera-Ducros, C.; Dumêtre, A.; Mbatchi, L.; Hutter, S.; Kraiem-M'Rabet, M.; Laget, M.; Remusat, V.; et al. Discovery of a New Antileishmanial Hit in 8-Nitroquinoline Series. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 54, 75–86.
- (324) Kieffer, C.; Cohen, A.; Verhaeghe, P.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Remusat, V.; M'Rabet, M. K.; Rault, S.; Rathelot, P.; et al. Looking for New Antileishmanial Derivatives in 8-Nitroquinolin-2(1H)-One Series. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 92, 282–294.
- (325) Kieffer, C.; Cohen, A.; Verhaeghe, P.; Paloque, L.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Valentin, A.; Rathelot, P.; et al. Antileishmanial Pharmacomodulation in 8-Nitroquinolin-2(1H)-One Series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23 (10), 2377–2386.
- (326) Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases—Criteria for Lead Progression. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2009**, 3 (8), e440.
- (327) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijn, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, 14 (11), 751–758.
- (328) Misani, F.; Bogert, M. T. The Search for Superior Drugs for Tropical Diseases; Further Experiments in the Quinoline Group. *J. Org. Chem.* **1945**, 10, 458–463.
- (329) Shahin, M. I.; Abou El Ella, D. A.; Ismail, N. S. M.; Abouzid, K. A. M. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Type-II VEGFR-2 Inhibitors Based on Quinoxaline Scaffold. *Bioorganic Chemistry* **2014**, 56, 16–26.
- (330) Patil, V. V.; Shankarling, G. S. Steric-Hindrance-Induced Regio- and Chemoselective Oxidation of Aromatic Amines. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80 (16), 7876–7883.
- (331) Johnson, O. H.; Hamilton, C. S. Syntheses in the Quinoline Series. II. Some Derivatives of 4-Methylquinoline and a Study of Their Structures. *Journal of the American Chemical Society* **1941**, 63 (11), 2864–2867.
- (332) Andreev, V. P.; Nizhnik, Y. P. Reaction of 2,4-Dibromoquinoline with Hydrogen Chloride. *Russian J. Org. Chem.* **2002**, 38 (1), 137–138.
- (333) Majumdar, K. C.; Kundu, N. Carbon–Carbon Bond Formation by Radical Cyclization: Regioselective Synthesis of *Spiro* Heterocyclic Compounds by <sup>n</sup> Bu<sub>3</sub> SnH-Mediated Reaction. *Synthetic Communications* **2006**, 36 (13), 1879–1886.
- (334) Cinelli, M. A.; Cordero, B.; Dexheimer, T. S.; Pommier, Y.; Cushman, M. Synthesis and Biological Evaluation of 14-(Aminoalkyl-Aminomethyl)Aromathecins as Topoisomerase I Inhibitors: Investigating the Hypothesis of Shared Structure–Activity Relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17 (20), 7145–7155.
- (335) van Oeveren, A.; Motamedi, M.; Martinborough, E.; Zhao, S.; Shen, Y.; West, S.; Chang, W.; Kallel, A.; Marschke, K. B.; López, F. J.; et al. Novel Selective Androgen Receptor Modulators: SAR Studies on 6-Bisalkylamino-2-Quinolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17 (6), 1527–1531.



- (336) Rosenhauer, E. Über Reaktionen von *N*-Alkyl- $\alpha$ -methylen-chinolanen, I.: Diazo-Kupplung der Methylenbase in neutraler Lösung. (Mitbearbeitet von O. Dannhofer.). *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1924**, 57 (8), 1291–1294.
- (337) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/c13-data/cdata.htm>, consulté le 25/07/2018.
- (338) Naik, M.; Humnabadkar, V.; Tantry, S. J.; Panda, M.; Narayan, A.; Guptha, S.; Panduga, V.; Manjrekar, P.; Jena, L. kumar; Koushik, K.; et al. 4-Aminoquinolone Piperidine Amides: Noncovalent Inhibitors of DprE1 with Long Residence Time and Potent Antimycobacterial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57 (12), 5419–5434.
- (339) O'Brien, N. J.; Brzozowski, M.; Wilson, D. J. D.; Deady, L. W.; Abbott, B. M. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted 3-Anilino-Quinolin-2(1H)-Ones as PDK1 Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, 22 (14), 3781–3790.
- (340) Nanashima, Y.; Yokoyama, A.; Yokozawa, T. Synthesis of Well-Defined Poly(2-Alkoxy-pyridine-3,5-Diyl) via Ni-Catalyst-Transfer Condensation Polymerization. *Macromolecules* **2012**, 45 (5), 2609–2613.
- (341) Kokatla, H. P.; Sil, D.; Malladi, S. S.; Balakrishna, R.; Hermanson, A. R.; Fox, L. M.; Wang, X.; Dixit, A.; David, S. A. Exquisite Selectivity for Human Toll-Like Receptor 8 in Substituted Furo[2,3-*c*]Quinolines. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56 (17), 6871–6885.
- (342) Koseki, Y.; Sugimura, T.; Ogawa, K.; Suzuki, R.; Yamada, H.; Suzuki, N.; Masuyama, Y.; Lin, Y. Y.; Usuki, T. Total Synthesis of Isodesmosine by Stepwise, Regioselective Negishi and Sonogashira Cross-Coupling Reactions: Total Synthesis of Isodesmosine. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015 (18), 4024–4032.
- (343) Marsais, F.; Godard, A.; Queguiner, G. Directed Ortho-lithiation of Chloroquinolines. Application to Synthesis of 2,3-disubstituted Quinolines. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, 26 (6), 1589–1594.
- (344) Zaragoza, F.; Stephensen, H.; Peschke, B.; Rimvall, K. 2-(4-Alkylpiperazin-1-Yl)Quinolines as a New Class of Imidazole-Free Histamine H<sub>3</sub> Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (1), 306–311.
- (345) Janiak, C. Synthesis of 6,6'-Diamino-2,2'-Biquinoline and 2,2'-Bi-1,6-Naphthyridine. *Synthesis* **1999**, 1999 (06), 959–964.
- (346) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* **2018**, 95 (2), 197–206.
- (347) Zubatyuk, R. I.; Gorb, L.; Shishkin, O. V.; Qasim, M.; Leszczynski, J. Exploration of Density Functional Methods for One-Electron Reduction Potential of Nitrobenzenes. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, 31 (1), 144–150.
- (348) Uchimiya, M.; Gorb, L.; Isayev, O.; Qasim, M. M.; Leszczynski, J. One-Electron Standard Reduction Potentials of Nitroaromatic and Cyclic Nitramine Explosives. *Environmental Pollution* **2010**, 158 (10), 3048–3053.
- (349) Roe, A. L.; Snawder, J. E.; Benson, R. W.; Roberts, D. W.; Casciano, D. A. HepG2 Cells: An in Vitro Model for P450-Dependent Metabolism of Acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 190 (1), 15–19.
- (350) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65 (1–2), 55–63.
- (351) Leifso, K.; Cohen-Freue, G.; Dogra, N.; Murray, A.; McMaster, W. R. Genomic and Proteomic Expression Analysis of Leishmania Promastigote and Amastigote Life Stages: The Leishmania Genome Is Constitutively Expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2007**, 152 (1), 35–46.
- (352) Esteves, M. A.; Fragiadaki, I.; Lopes, R.; Scoulica, E.; Cruz, M. E. M. Synthesis and Biological Evaluation of Trifluralin Analogues as Antileishmanial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18 (1), 274–281.
- (353) Navizet, I.; Liu, Y.-J.; Ferré, N.; Roca-Sanjuán, D.; Lindh, R. The Chemistry of Bioluminescence: An Analysis of Chemical Functionalities. *ChemPhysChem* **2011**, 12 (17), 3064–3076.
- (354) Perdry, H.; Gutzkow, K. B.; Chevalier, M.; Huc, L.; Brunborg, G.; Boutet-Robinet, E. Validation of Gelbond® High-Throughput Alkaline and Fpg-Modified Comet Assay Using a Linear Mixed Model: Validation of High-Throughput Comet Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2018**, 59 (7), 595–602.
- (355) Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H. The Effect of Plasma Protein Binding on in Vivo Efficacy: Misconceptions in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9 (12), 929–939.
- (356) Pedron, J.; Boudot, C.; Hutter, S.; Bourgeade-Delmas, S.; Stigliani, J.-L.; Sournia-Saquet, A.; Moreau, A.; Boutet-Robinet, E.; Paloque, L.; Mothes, E.; et al. Novel 8-Nitroquinolin-2(1H)-Ones as NTR-Bioactivated Antikinetoplastid Molecules: Synthesis, Electrochemical and SAR Study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 155, 135–152.
- (357) Moores, I. G.; Smalley, K.; Suschitzky, H. ALKALINE HYDROLYSIS OF Z-



- (380) Reisch, J.; Bathe, A. *Naturstoffchemie*, 114. Dictamnin und Derivate durch Pd/Cu-katalysierte Alkin-Kupplung. *Liebigs Annalen der Chemie* **1988**, 1988 (1), 69–73.
- (381) Reisch, J.; Nordhaus, P. Acetylenchemie. 18. Mitt.: Molekülvariationen Am Rutaceenalkaloid Dictamnin via Pd/Cu Katalysierte Alkin-kupplung. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 167–171.
- (382) Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Hughes, D. L.; King, A. O.; Verhoeven, T. R. Mechanistic Studies of the Suzuki Cross-Coupling Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59 (26), 8151–8156.
- (383) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews* **1995**, 95 (7), 2457–2483.
- (384) Chong, E.; Schafer, L. L. 2-Pyridonate Titanium Complexes for Chemoselectivity. Accessing Intramolecular Hydroaminoalkylation over Hydroamination. *Organic Letters* **2013**, 15 (23), 6002–6005.
- (385) Kuduk, S. D.; Skudlarek, J. W.; Di Marco, C. N.; Bruno, J. G.; Pausch, M. A.; O'Brien, J. A.; Cabalu, T. D.; Stevens, J.; Brunner, J.; Tannenbaum, P. L.; et al. Synthesis and Evaluation of Carbon-Linked Analogs of Dual Orexin Receptor Antagonist Filorexant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24 (7), 1784–1789.
- (386) Sakamoto, T.; An-Naka, M.; Kondo, Y.; Yamanaka, H. Condensed Heteroaromatic Ring Systems. VIII. : Synthesis of 3-Substituted Isocoumarins from o-Halobenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 2719.
- (387) Viaud-Massuard, M.-C.; Van de Poël, H.; Guillaumet, G. Synthesis of Melatonin Analogues Derived from Furo[2,3-b]- and [2,3-c]Pyridines by Use of a Palladium-Copper Catalyst System. *HETEROCYCLES* **2002**, 57 (1), 55–71.
- (388) Zhou, R.; Wang, W.; Jiang, Z.; Wang, K.; Zheng, X.; Fu, H.; Chen, H.; Li, R. One-Pot Synthesis of 2-Substituted Benzo[b]Furans via Pd-Tetrphosphine Catalyzed Coupling of 2-Halophenols with Alkynes. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (45), 6023–6026.
- (389) Volkov, O. A.; Cosner, C. C.; Brockway, A. J.; Kramer, M.; Booker, M.; Zhong, S.; Ketcherside, A.; Wei, S.; Longgood, J.; McCoy, M.; et al. Identification of *Trypanosoma Brucei* AdoMetDC Inhibitors Using a High-Throughput Mass Spectrometry-Based Assay. *ACS Infectious Diseases* **2017**, 3 (7), 512–526.
- (390) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, 41 (7), 1007–1010.
- (391) van de Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. Estimation of Blood-Brain Barrier Crossing of Drugs Using Molecular Size and Shape, and H-Bonding Descriptors. *Journal of Drug Targeting* **1998**, 6 (2), 151–165.
- (392) Pedron, J.; Boudot, C.; Bourgeade-Delmas, S.; Sournia-Saquet, A.; Paloque, L.; Rastegari, M.; Abdoulaye, M.; El-Kashef, H.; Bonduelle, C.; Pratiel, G.; et al. Antitrypanosomatid Pharmacomodulation at Position 3 of the 8-Nitroquinolin-2(1 H )-One Scaffold Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions. *ChemMedChem* **2018**, 13, 2217–2228.
- (393) Glasnov, T. N.; Stadlbauer, W.; Kappe, C. O. Microwave-Assisted Multistep Synthesis of Functionalized 4-Arylquinolin-2(1H)-Ones Using Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70 (10), 3864–3870.
- (394) Fernandez, M.; De la Cuesta, E.; Avendano, C. Metallation of 2(1H)-Quinolinone: Synthesis of 3-Substituted Compounds. *Synthesis* **1995**, 1995 (11), 1362–1364.
- (395) Cañibano, V.; Rodríguez, J. F.; Santos, M.; Sanz-Tejedor, M. A.; Carreño, M. C.; González, G.; García-Ruano, J. L. Mild Regioselective Halogenation of Activated Pyridines with N-Bromosuccinimide. *Synthesis* **2001**, 2001 (14), 2175–2179.
- (396) Tee, O. S.; Paventi, M. Kinetics and Mechanism of Bromination of 2-Pyridinone and Related Derivatives in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104 (15), 4142–4146.
- (397) Naik, P.; Cucullo, L. In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Current and Perspective Technologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, 101 (4), 1337–1354.



## **Synthèse et étude de l'activité anti-kinétoplastidés de nouvelles 8-nitroquinoléin-2(1H)-ones bioactivées par les nitroréductases de type 1.**

Les kinétoplastidés sont des protozoaires flagellés responsables de maladies tropicales négligées mortelles telles que la leishmaniose viscérale (*L. donovani* et *L. infantum*) ou la trypanosomiase humaine africaine (*T. brucei*), pour lesquelles les traitements disponibles sont très limités. Depuis quelques années, on observe un regain d'intérêt pour le développement de nitrohétérocycles aromatiques anti-infectieux tels que le delamanide et le féxinidazole. De récentes études indiquent que l'activité anti-kinétoplastidés de ces dérivés repose sur leur bioactivation sélective par des nitroréductases parasitaires, conduisant à la formation de métabolites réduits électrophiles, fortement cytotoxiques. Suite à des études préliminaires réalisées dans notre équipe en série 8-nitroquinoléin-2(1H)-one, ces travaux de thèse portent sur la synthèse et l'étude *in vitro* de l'activité antiparasitaire de 80 dérivés notamment fonctionnalisés en positions 3 et 6 du pharmacophore par divers motifs, notamment *via* la mise au point de réactions d'halogénéation sélective et de couplages pallado-catalysés. Ainsi, 5 nouvelles molécules hits (4 anti-kinétoplastidés et 1 sélective de *T. brucei*) ont été identifiées ( $0,01 \mu\text{M} \leq \text{CI}_{50} \leq 7 \mu\text{M}$  et  $13 < \text{IS} < 1500$ ), trois d'entre-elles étant des substrats sélectifs des nitroréductases parasitaires de type I. Afin de préciser les relations structure-activité, une étude des potentiels de réduction a également été menée. Des études physico-chimiques (solubilité, test de perméabilité PAMPA) et pharmacocinétiques *in vitro* (stabilité microsomale et fixation à l'albumine humaine) sont venues compléter ce travail. Enfin, des évaluations de la mutagénicité et de la génotoxicité de ces hits sur des cellules procaryotes et humaines ont été conduites, dans le but de statuer sur leur potentiel pharmaceutique antiparasitaire humain et vétérinaire.

**Mots-clés :** Maladies tropicales négligées, leishmaniose viscérale, trypanosomiase humaine africaine, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei brucei*, activité *in vitro*, hétérocycles nitroaromatiques, 8-nitroquinoléin-2(1H)-one, relations structure-activité, nitroréductases, électrochimie, pharmacomodulation anti-kinétoplastidés, couplages pallado-catalysés, cytotoxicité sur HepG2, mutagénicité, génotoxicité, test d'Ames, test des comètes.

## **Synthesis and study of the antikinetoplastid activity of new 8-nitroquinolin-2(1H)-ones bioactivated by type 1 nitroreductases.**

Kinetoplastids are flagellated protozoan parasites responsible for lethal neglected tropical diseases, such as visceral leishmaniasis (*L. donovani* and *L. infantum*) or sleeping sickness (*T. brucei brucei*), for which very few drugs are available. Nowadays, nitroheterocyclic compounds present a renewed interest as anti-infective agents, as illustrated by the development of fexinidazole and delamanid. Some recent studies demonstrated that the antikinetoplastid activity of these derivatives involves their selective bioactivation by parasitic nitroreductases, leading to the formation of electrophilic reduced metabolites, highly cytotoxic. Based on preliminary studies conducted in our team in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series, this PhD work is about the synthesis and *in vitro* antiparasitic study of 80 derivatives mainly functionalized at positions 3 and 6 of the pharmacophore by various substituents, especially *via* the optimization of selective halogenation and pallado-catalyzed cross coupling reactions. Thereby, 5 new hit compounds (4 antikinetoplastid and 1 selective of *T. brucei*) were identified ( $0.01 \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 7 \mu\text{M}$  and  $13 < \text{SI} < 1500$ ), three of them being selective substrates of type I parasitic nitroreductases. In order to refine the structure-activity relationship studies, an analysis of reduction potentials was also conducted. *In vitro* physicochemical (solubility, PAMPA permeability assay) and pharmacokinetic (microsomal stability and human albumin binding) experiments completed this work. Finally, the mutagenicity and genotoxicity evaluations of these new hit compounds toward prokaryotic and human cells were realized, in order to assess their human and veterinary antiparasitic pharmaceutical potential.

**Keywords :** Neglected tropical diseases, visceral leishmaniasis, human african trypanosomiasis, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei brucei*, *in vitro* activity, nitroaromatic heterocycles, 8-nitroquinolin-2(1H)-one, structure-activity relationships, nitroreductases, electrochemistry, antikinetoplastid pharmacomodulation, pallado-catalyzed cross coupling reactions, cytotoxicity on HepG2 cell line, mutagenicity, genotoxicity, Ames test, comet assay.